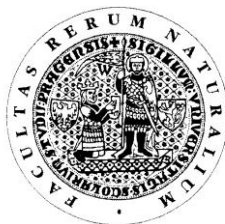


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Šárka Rákosníková

Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na  
rtuťové visící kapkové elektrodě

The study of electrochemical reduction of deoxycholic and ursodeoxycholic acid  
at hanging mercury drop electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2014

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. srpna 2014.

## Abstrakt

Deoxycholová a ursodeoxycholová kyselina se řadí mezi běžné žlučové kyseliny. Tato bakalářská práce se zabývá elektrochemickou redukcí obou kyselin na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE); k jejich studiu byly použity metody DC voltametrie, diferenční pulsní voltametrie a cyklické voltametrie.

Deoxycholová kyselina a ursodeoxycholová kyselina poskytují v rozmezí pH 3,0 – 12,0 katodický signál v oblasti vysoce záporných potenciálů, ca  $-1200$  mV až  $-1300$  mV. Při pH BR pufru 6,0 – 12,0 dochází ke vzniku dalšího redukčního píku. Výška píků je výrazně závislá na pH základního elektrolytu. Nižší píky se vyskytují v zásaditých a neutrálních prostředích, výrazný nárůst proudu píku, případně jejich posun do oblasti zápornějších potenciálů nastává v rozmezí pH 5,0 – 4,0. Důvodem změny chování kyselin je pravděpodobně protonizace karboxylové skupiny při těchto pH, blízkých jejich hodnotě pKa. Tato skutečnost byla pozorována u obou kyselin při měření metodou DCV i DPV. Jejich koncentrační závislost v rozmezí koncentrace  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $5 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> v pH BR pufru 9,0 a 4,0 jeví nelineární průběh, případně linearitu v úzkém rozsahu koncentrací.

Metoda cyklické voltametrie v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 12,0 prokázala, že obě kyseliny poskytují pár katodický/anodický pík, příslušný elektrodový děj lze klasifikovat jako quasireverzibilní. Oba tyto děje jsou řízeny adsorpcí.

## Abstract

Deoxycholic Acid and ursodeoxycholic acid belongs to common bile acids. This thesis deals with the electrochemical reduction of both acids at the hanging mercury drop electrode (HMDE); for their study DC voltammetry, differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry were used.

In the pH range of 3.0 to 12.0, deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid provide a cathodic signal in the highly negative potentials, ca  $-1200$  mV up to  $-1300$  mV. With BR buffer at pH 6.0 to 12.0 another reducing peak is observed. The height of the peaks is significantly dependent on the pH of the basic electrolyte. Low peaks occur in alkaline and neutral environments, significant increase of the peak current or the shift to more negative potentials occurs in the pH range 5.0 to 4.0. The reason for this change in behavior is most likely the protonation of the carboxyl groups at these pHs near their  $pK_a$ s. This was observed with both acids using DCV and DPV methods. The concentration dependence of the concentration range of  $1.10^{-6}$  to  $5.10^{-4}$  mol.l $^{-1}$  in BR buffer pH 9.0 and 4.0 appears non-linear or linear in a narrow range of concentrations.

Cyclic voltammetry in an environment of BR buffer - methanol (9:1) a pH of 12.0 showed that both acids provide cathodic / anodic peak pair, respective electrode plot can be classified as quasireversible. Both of these processes are controlled by adsorption.

Předmětová hesla: analytická chemie  
rtuťová elektroda  
voltametrie  
žlučové kyseliny

Klíčová slova: kyselina deoxycholová  
kyselina ursodeoxycholová  
DC voltametrie  
diferenční pulsní voltametrie  
cyklická voltametrie  
visící rtuťová kapková elektroda

## Poděkování

Chtěla bych především poděkovat své školitelce paní RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři i při sepisování práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodinně za podporu a kamarádce Adéle Patákové za užitečné rady.

## Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. ÚVOD	10
1.1. Cíl práce	10
1.2. Žlučové kyseliny	10
1.2.1. Deoxycholová kyselina	11
1.2.2. Ursodeoxycholová kyselina	12
1.3. Analytické metody stanovení studovaných žlučových kyselin	14
1.4. Voltametrické metody	16
1.4.1. DC voltametrie	16
1.4.2. Diferenční pulzní voltametrie	17
1.4.3. Cyklická voltametrie	17
1.5. Visící rtuťová kapková elektroda	18
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
2.1. Reagencie	19
2.2. Aparatura	19
2.3. Pracovní postupy	20
2.4. Vyhodnocení výsledků	21
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	22
3.1. DC voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny	22
3.1.1. Vliv pH prostředí na chování deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny	22
3.1.2. Koncentrační závislost deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny	27
3.2. Diferenční pulsní voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny	38
3.2.1. Vliv pH prostředí na chování deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny	38

3.2.2. Koncentrační závislost deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny.....	42
3.3. Cyklická voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny .....	54
3.3.1. Deoxycholová kyselina při pH BR pufru 12.....	54
3.3.2. Ursodeoxycholová kyselina při pH BR pufru 12.....	60
4. ZÁVĚR.....	65
Literatura.....	66



## Seznam použitých zkratk

BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CMC	kritická micelární koncentrace
CV	cyklická voltametrie
DCA	deoxycholová kyselina
DCV	stacionární voltametrie (direct current voltammetry)
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E$	potenciál
$E_a$	anodický potenciál
$E_k$	katodický potenciál
$E_p$	potenciál píku
ELSD	evaporative light scattering detector
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	proud
$I_a$	anodický proud
$I_k$	katodický proud
$I_p$	proud píku
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
$m$	hmotnost
$n$	počet vyměňovaných elektronů
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty
PVC	polyvinylchlorid
UDCA	ursodeoxycholová kyselina
UV	ultrafialový

# 1. ÚVOD

## 1.1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce je studium redukce ursodeoxycholové a deoxycholové kyseliny na visící rtuťové kapkové elektrodě za použití metod DC voltametrie, diferenční pulsní voltametrie a cyklické voltametrie a ověření možnosti využití elektrochemické redukce ke stanovení těchto kyselin.

## 1.2 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou hydroxyl-deriváty steroidů  $5\beta$ -cholan-24-ové kyseliny<sup>1</sup>. Tyto steroidní deriváty hrají důležitou fyziologickou roli při trávení a vstřebávání tuků<sup>2</sup>. Jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech a poté jsou hromaděny v žlučníku<sup>3</sup>.

Žlučové kyseliny jsou zodpovědné za rozpouštění cholesterolu a tuků prostřednictvím micel, které vytvářejí jejich sole. Skládají se ze dvou jednotek, kterými jsou steroidní jádro a krátký alifatický postranní řetězec. Steroidní jádro obsahuje tři šestičlenné kruhy (A, B a C) a jeden pětičlenný kruh (D). Dále obsahují dvě methylové skupiny v poloze C<sub>18</sub> a C<sub>19</sub> (cit.<sup>3</sup>). Žlučové kyseliny se dělí na dvě třídy v závislosti na délce bočního řetězce na uhlících C<sub>24</sub> a C<sub>27</sub>. Třídy C<sub>27</sub> kyselin jsou konjugovány s taurinem, třída C<sub>24</sub> kyselin je v konjugaci s taurinem a glycinem<sup>3</sup>. Za určitých podmínek tvoří žlučové kyseliny či jejich soli gely. Tyto gely mohou být příslibem pro budoucnost biomateriálů<sup>3</sup>.

Ve struktuře žlučových kyselin jsou obsaženy jak hydrofilní -OH, tak hydrofobní -CH<sub>3</sub> skupiny, díky nimž vytváří povrchově aktivní supramolekuly. Tyto supramolekuly by mohly sloužit jako potencionální nosiče léčiv<sup>4</sup>.

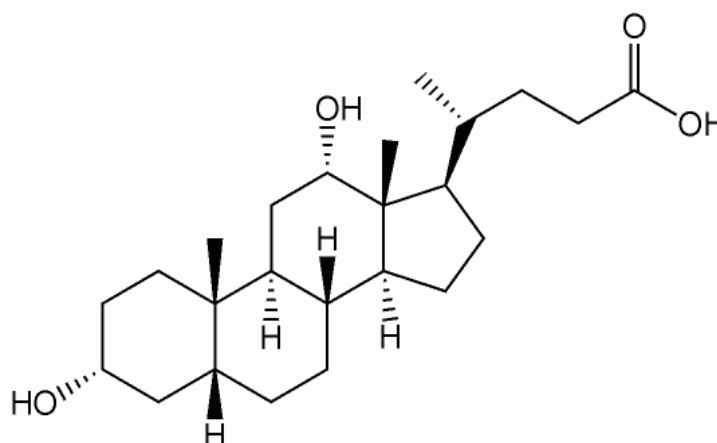
Předpokládá se, že elektrochemická redukce žlučových kyselin je umožněna díky přítomnosti karboxylové skupiny COOH na C<sub>24</sub><sup>1</sup>.

Poslední studie ukazují, že některé naše stravovací návyky výrazně ovlivňují

metabolismus žlučových kyselin a ty pak mohou hrát určitou roli v procesu karcinogeneze. Bylo prokázáno, že nadměrný příjem živočišných tuků v potravě zásadně přispívá k vzniku rakoviny střeva žlučníku<sup>3</sup>.

#### 1.2.1. Deoxycholová kyselina

Deoxycholová kyselina (DCA) je bílý nebo téměř bílý prášek. Je to látka málo rozpustná ve vodě (uvádí se  $0,028 \text{ mmol.l}^{-1}$  (cit. <sup>8</sup>)), rozpouští se v 96% ethanolu. DCA je hlavní žlučovou kyselinou u králíků, vyskytuje se také u lenochodů, vorvaňů a u některých primátů<sup>5</sup>. Její struktura je uvedena na **obr. 1** a základní fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v **tab 1**.



**Obr. 1** Chemická struktura deoxycholové kyseliny.

**Tab. 1** Fyzikálně-chemické vlastnosti DCA<sup>6,7,8</sup>.

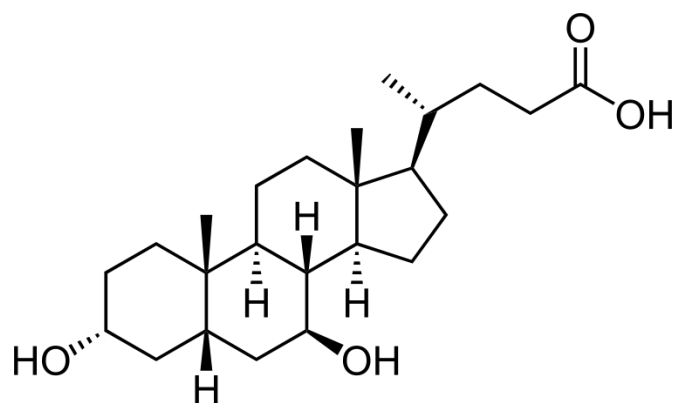
Název	Deoxycholic Acid
Zkratka	DCA
Název dle IUPAC	3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-ová kyselina
Stechiometrický vzorec	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>
číslo C.A.S.	83-44-3
Relativní molární hmotnost	392,572
Rozpustnost ve vodě	0,028 mmol.l <sup>-1</sup>
Teplota tání	177 ° C
pK <sub>a</sub>	4,65
CMC*	10 mM

\* kritická micelární koncentrace ve vodě při 25 °C

DCA se podílí na řadě fyziologických pochodů: zvyšuje biologickou degradaci malých částecek v ústech, chová se jako choleretikum při jaterních dysfunkcích a některé deriváty jsou používány při léčbě malárie a v kosmetických přípravcích. Ve směsi s fosfatidylcholinem byla používána jako aktivní komponenta k podkožní injekční lipolýze (kosmetický zákrok) v Brazílii, později byla tato směs nahrazena čistou DCA. DCA také působí jako detergent při rozpouštění tuků a tak usnadňuje jejich absorpci ve střevu<sup>7</sup>.

### 1.2.2. Ursodeoxycholová kyselina

Ursodeoxycholová kyselina (UDCA) je bílý nebo téměř bílý prášek. Ve vodě je omezeně nerozpustná (uvádí se rozpustnost ve vodě 0,0009 mol.l<sup>-1</sup> (cit. <sup>8</sup>)). Rozpouští se dobře v 96% ethanolu nebo acetonu<sup>10</sup>. UDCA je hlavní žlučová kyselina nutrií, medvědů a bobrů<sup>1</sup>. Na **obr. 2** je uveden strukturní vzorec UDCA. Fyzikálně-chemické vlastnosti pro UDCA jsou zaznamenány v **tab. 2**.



**Obr. 2** Chemická struktura UDCA.

**Tab. 2** Fyzikálně- chemické vlastnosti UDCA<sup>1,7,8</sup>.

Název	ursodeoxycholic acid
Zkratka	UDCA
Název dle IUPAC	3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy- 5 $\beta$ -cholan 24-ová kyselina
Stechiometrický vzorec	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>
číslo C.A.S.	128-13-2
Relativní molární hmotnost	392,57
Rozpustnost ve vodě	0,0009 mmol.l <sup>-1</sup>
Teplota tání	203 ° C
pK <sub>a</sub>	4,6
CMC*	19 mM

\* kritická micelární koncentrace ve vodě při 25 °C

UDCA je jednou ze sekundárních žlučových kyselin. Používá se k regulaci hladiny cholesterolu – snižuje rychlost absorpce cholesterolu střevem a zároveň rozbíjí micely obsahující cholesterol, čímž zvyšuje jeho množství. Tím tedy také podporuje biosyntézu žlučových kyselin a jejich sekreci.

Podávání lékové formy UDCA snižuje toxicitu cirkulující žlučové kyseliny<sup>6</sup>. Vzhledem k této vlastnosti se UDCA používá k léčbě žlučových kamenů a tím oddaluje

potřebný chirurgický zákrok<sup>7</sup>. Další využití je při léčbě primární biliární cirhózy, primární sklerozující cholangitidy, jako prevence návratu akutní pankreatitidy a slouží k redukci množství alaninaminotranferasy při hepatitidě C (cit. <sup>9</sup>). Výhodou léčby pomocí UDCA je, že dosud nebyly prokázány nežádoucí účinky<sup>7</sup>.

Nejpravděpodobnějším projevem předávkováním UDCA je průjem, který se léčí symptomaticky<sup>11</sup>.

### **1.3. Analytické metody stanovení žlučových kyselin**

Mezi metody sloužící k měření množství obou kyselin, DCA i UDCA, ve farmaceutických produktech patří voltametrie, fluorimetrie či spektrofotometrie, reversní HPLC a micelární elektrochemická chromatografie. Všechny tyto metody mají však své nevýhody, mezi jinými např. vysoké náklady<sup>9</sup>.

Reversní HPLC je jedna z nejlepších a nejspolehlivějších metod pro přímou a nedestruktivní analýzu méně těkavých, polárních a nestabilních steroidních látek a jejich konjugátů. Reversní HPLC využívá UV detekci v rozsahu vlnových délek 200 – 210 nm. S nižší citlivostí se dá použít pro detekci žlučových kyselin konjugovaných s glycinem a taurinem, pro detekci volných nevázaných kyselin a jejich sulfo- a glyko-konjugátů je tato detekce nepoužitelná. Dalšími používanými detekčními technikami bývá fluorescenční spektrometrie, refraktometrická detekce a elektrochemická detekce<sup>12</sup>. Tyto metody však mohou vyžadovat před kolonovou derivatizací, např. v případě fluorescence je potřeba do molekuly žlučové kyseliny zavést chromofor, protože tuto vlastnost přirozeně nemají<sup>12</sup>.

Nejčastější derivatizační metodou je navázání molekuly chromoforu na C<sub>24</sub> karboxylovou skupinu. Nevýhodou této metody však je, že pouze nekonjugované kyseliny a jejich glycinové, sulfonové a glykované formy jsou reaktivní. Ostatní konjugáty s taurinem a pyranosou musí být derivatizovány jinak. Z tohoto důvodu byla vyvinuta HPLC spojená s ELSD detektorem (evaporative light scattering detector). Tato

detekce poskytuje univerzální odezvu pro všechny typy konjugovaných i nekonjugovaných žlučových kyselin. Oproti UV a refraktometrické detekci má vysokou citlivost a stabilitu základní linie<sup>12</sup>.

Pro elektrochemické použití byla vyvinuta membránová elektroda založená na PVC pro monitorování vybraných iontů žlučových kyselin, jmenovitě pro kyseliny cholovou, deoxycholovou a chenodeoxycholovou<sup>13</sup>. Tato elektroda je univerzální a může být použita pro všechny dané kyseliny, oproti použití 3 různých elektrod pro každou látku. Výhodou této elektrody je, že může být opakovaně použita, aniž by ztrácela membránovou aktivitu. Měření s touto elektrodou byla reproduktivní, analýza měla krátký čas odezvy a byla použita pro měření kritické micelární koncentrace. Membránová elektroda založená na PVC byla vyvinuta pro studium interakce vybraných žlučových kyselin s proteiny<sup>13</sup>.

Voltametrické metody byly použity při studiu interakce žlučových kyselin s ionty těžkých kovů. Ve žlučníku jsou vedle cholesterolu a fosfolipidů přítomné také ionty  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Závislost limitního proudu volných iontů těžkých kovů a odpovídajících půlvlnových potenciálů na koncentraci volných žlučových kyselin poskytuje informaci o interakci aniontů žlučových kyselin s ionty těžkých kovů. Touto studií bylo nakonec zjištěno, že ionty těžkých kovů pouze zanedbatelně interagují se žlučovými kyselinami<sup>14</sup>.

Klasickou DC polarografií bylo studováno a porovnáváno chování vybraných žlučových kyselin, včetně porovnání jejich konjugovaných a nekonjugovaných forem. Byly hledány nejvhodnější podmínky analýzy a možnost stanovení chenodeoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny ve farmaceutických přípravcích. V neposlední řadě byla tato metoda použita pro měření celkové koncentrace žlučových kyselin v lidské žluči. Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení s pracovní rtuťovou kapkovou elektrodou<sup>15</sup>.

Levná kolorimetrická metoda stanovení žlučových kyselin je založená na tvorbě komplexu cyklodextrin-fenolftalein. Cyklodextriny ovlivňují vlastnosti látek, s nimiž se váží. Ovlivňují jejich rozpustnost, chemickou stabilitu, absorpci a biologickou dostupnost. Z tohoto důvodu jsou hojně používány ve farmakologii<sup>9</sup>.

Lipofilní vlastnosti DCA a UDCA spolu s dalšími žlučovými kyselinami byly zkoumány pomocí extrakce kapalina-kapalina za použití směsi 1-oktanol/voda. Měření

bylo prováděno při různých hodnotách pH, při odlišné iontové síle roztoků a při hodnotách koncentrace žlučových kyselin pod hodnotou jejich kritické micelární koncentrace. Experimentální data byla získána jak pro protonizované, tak pro deprotonizované formy kyselin. Jako srovnávací metoda byla použita reversní HPLC se stacionární C<sub>18</sub> fází. Na základě získaných hodnot z reversní HPLC bylo prokázáno, že DCA je nejvíce lipofilní žlučová kyselina, UDCA je pak na třetím místě za chenodeoxycholovou kyselinou<sup>15</sup>.

## **1.4. Voltametrické metody**

Při voltametrii se sleduje závislost proudu procházející polarizovatelnou pracovní elektrodou, která je ponořena do analyzovaného roztoku, na potenciálu, který je na elektrodu vkládán z vnějšího zdroje. Výsledkem je polarizační křivka a analytickým signálem je velikost proudu<sup>16,17</sup>. Pokud v roztoku není látka, která by se redukovala či oxidovala (neboli elektroaktivní látka) je pracovní elektroda zpolarizována a proud jí neprotéká. Je-li v roztoku elektroaktivní látka, dochází k depolarizaci elektrody a začne elektrodou procházet proud<sup>16</sup>.

Při měření se elektrochemický článek skládá z pracovní elektrody, referentní elektrody a pomocné elektrody. Tomuto zapojení se říká tříelektrodové. Při tomto zapojení proud prochází pouze mezi pracovní a pomocnou elektrodou a skutečný potenciál pracovní elektrody se měří mezi pracovní a referentní elektrodou za bezproudového stavu. Zdrojem napětí je potenciostat<sup>17</sup>.

### *1.4.1. DC voltametrie*

Při metodě DCV se potenciál vkládáný na pracovní elektrodu lineárně s časem mění (roste nebo klesá). Rychlost změny potenciálu je dostatečně malá ve srovnání s rychlostí ustavované rovnováhy u elektrody, takže lze metodu považovat za



stacionární při konstantním potenciálu. Výsledkem je polarizační křivka, na které se přítomnost analytu v roztoku projeví voltametrickou vlnou<sup>17</sup>.

#### 1.4.2. *Diferenční pulzní voltametrie*

Diferenční pulzní voltametrie má v současné době veliký význam. Potenciál se mění lineárně s časem, vkládá se napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek ms<sup>17</sup>. Zaznamenává se rozdíl proudů změřených těsně před vložením potenciálu a následně na jeho konci. Výsledkem měření je voltametrická křivka, který má tvar píku, přičemž poloha píku na potenciálové ose je blízká půlvlnovému potenciálu a výška píku je závislá na koncentraci analytu. Metodou DPV lze stanovit i nižší koncentrace látek v porovnání s metodou DCV<sup>16</sup>.

#### 1.4.3. *Cyklická voltametrie*

Cyklická voltametrie je metodou, při níž se na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí změny polarizace. Výsledkem je polarizační křivka, která má tvar píku, proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu. Přímé analytické využití metody je malé, hlavní význam má při studiu elektrodových reakcí.

Z průběhu katodických a anodických křivek je možno usuzovat na mechanismus elektrodové reakce, např. posuzovat její reverzibilitu, která se určuje na základě několika parametrů: 1) rozdíl katodického a anodického proudu píku se rovná  $-0,059 \text{ V}/n$ , kde  $n$  je počet vyměňovaných elektronů; 2) podíl proudů anodického a katodického píku  $I_{pa}/I_{pk} = 1$ ; 3) potenciál píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu  $dE/dt$  a je o  $28,5/n \text{ mV}$  negativnější (u katodického píku) či pozitivnější (u anodického píku) než půlvlnový potenciál.

U děje, který je řízen adsorpcí (tzn., že látka je adsorbovaná na povrch pracovní elektrody), je výška píku úměrná rychlosti polarizace. U dějů, které jsou řízené difúzí je přímá úměra mezi výškou píku a odmocninou z rychlosti polarizace<sup>17</sup>.

## 1.5. Visící rtuťová kapková elektroda

Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) se skládá z obnovitelné kapky rtuti na konci jemné kapiláry<sup>18</sup>. Má menší nabíjecí proud proti ostatním rtuťovým elektrodám<sup>17</sup>. Tato elektroda je mohutná a obsahuje nádrž na rtuť. Je to citlivá elektroda, která vyžaduje pravidelnou údržbu, ale díky tomu nám umožňuje vysoce reprodukovatelné měření za nízké spotřeby rtuti a umožňuje adsorpční a elektrochemické akumulace analytů na povrch elektrody. Látka, kterou stanovujeme na rtuťové elektrodě, musí být elektroaktivní (tzn., že musí probíhat elektoredukce či elektrooxidace). Daná elektroaktivní látka musí být rozpustná v rozpouštědle, které je vodivé. Používání rtuti je v některých státech zakázáno, jelikož rtuť znamená riziko otravy<sup>18</sup>.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. Reagencie

Studované látky: ursodeoxycholová kyselina a deoxycholová kyselina (>99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztoky studovaných žlučových kyselin o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  byly připraveny navážením  $m = 0,09823 \text{ g}$  kyseliny ursodeoxycholové a  $m = 0,09832 \text{ g}$  deoxycholové kyseliny, následně kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněny po rysku methanolem ( $\geq 99,9\%$ , Merck, Germany).

K přípravě kyselé složky BR pufru byly použity kyseliny: čistá kyselina octová (Lachema, Brno, ČR), 85% kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR) a kyselina boritá (čistota p.a., Penta, Chrudim, ČR). Všechny kyseliny byly o koncentraci  $c = 0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ .

K přípravě zásadité složky byl použit  $c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  hydroxid sodný (čistota p.a., Lachema, Brno, ČR)

### 2.2. Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo polarograf řízeném počítačovým softwarem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP. Všechna měření probíhala v tříelektrodovém zapojení.

Pracovní elektrodou pro všechna měření byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) typu UM $\mu$ E (Eco-Trend Plus, Praha, ČR), referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda ( $3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$ ) a pomocnou elektrodou byl platinová

drátková elektroda (obě Elektrochemické detektory, Turnov, ČR). Pro výpočet plochy kapky se postupovalo následujícím způsobem: do zvážené polarografické nádoby s roztokem  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  chloridu draselného s trochou rtuti bylo nakapáno 30 kapek rtuti a byla vypočtena hmotnost jedné kapky  $m = 2,917 \cdot 10^{-3} \text{ g}$  a z ní vypočítaná plocha kapky  $0,0174 \text{ cm}^2$  za předpokladu, že kapka má tvar ideální koule.

K přípravě pufru byla použita deionizovaná voda (Milli-Q<sub>plus</sub> systém, Millipore, Billerica, MA, USA) a hodnota pH byla měřena pomocí pH-metru Jenway (Jenway, Staffordshire, UK).

### 2.3. Pracovní postup

Pro voltametrická měření byly připravené zásobní roztoky DCA a UDCA o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  dále zředěny na koncentraci  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  a to tak, že do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo automatickou pipetou odpipetováno 500  $\mu\text{l}$  studované žlučové kyseliny o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  následně bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  methanolu a poté doplněno BR pufrém po rysku baňky. Výsledný poměr methanol : BR pufr byl tedy 1 : 9. Poté byl roztok převeden do měřicí nádoby pro voltametrii a před vlastním měřením probublán 5 minut dusíkem, aby se odstranil kyslík. Během měření byl dusík přiváděn pouze nad roztok. Probublávačka byla naplněna směsí deionizovaná voda – methanol v poměru 9 : 1.

Při měření metodou DC voltametrie byla rychlost polarizace  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ , u metody DP voltametrie byla rychlost polarizace  $20 \text{ mV.s}^{-1}$ . U DPV byly použity následující parametry pulsu: výška pulzu  $-50 \text{ mV}$  a šířka pulzu  $-80 \text{ ms}$ . Každé měření bylo vždy opakováno čtyřikrát.

Při měření koncentrační závislosti metodou DCV a DPV bylo postupováno tak, že do polarografické nádoby bylo dáno 10 ml základního elektrolytu, kde byl poměr BR pufr – methanol (9:1). Po změření voltamogramu základního elektrolytu byl postupně do té samé polarografické nádoby přidán zásobní roztok příslušné kyseliny o

koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  o příslušném objemu, čímž se postupně zvyšovala koncentrace, ale i poměr BR pufr – methanol. Každé měření bylo opakované čtyřikrát.

## **2.4. Vyhodnocení výsledků**

Pro vyhodnocení všech naměřených dat při metodě DC voltametrie, DP voltametrie a cyklické voltametrie byl použit program Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). K určení výšky píku byla použita metoda prodloužení základní linie před nástupem píku. K tvorbě grafů sloužil program OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Tabulky a výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA). Veškeré vyhodnocení probíhalo v operačním systému Windows 7.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1. DC voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

##### 3.1.1. *Vliv pH prostředí na chování deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny*

Studium chování kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové o  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  metodou DCV na HMDE bylo prováděno v prostředí BR pufr – methanol (9:1), kdy hodnoty pH BR pufru byly: 12,0; 10,0; 9,0; 8,0; 7,0; 6,0; 5,0; 4,0 a 3,0. Tyto kyseliny DCA i UDCA poskytují ve studovaném prostředí katodický pík v oblasti vysoce záporných potenciálů, proud píku je významně ovlivněn hodnotou pH. Zároveň DCA vykazuje v oblasti pH 12,0 – 6,0 druhý pík s konstantním potenciálem ca – 1420 mV, jehož výška a ostrost roste s rostoucím pH. Tento pík nebyl dále vyhodnocován. Při pH BR pufru 2,0 nebyl již voltametrický signál zaznamenán kvůli zkrácení potenciálového okna v důsledku dřívějšího vývinu vodíku v kyselém prostředí. Příslušné hodnoty velikosti potenciálu píku a proudu píku pro daná pH jsou uvedeny v **tab. 3** a k tomu příslušné voltamogramy pro DCA jsou na **obr. 3** a pro UDCA na **obr. 4**. Z těchto voltamogramů je patrné, že obě kyseliny mají přibližně konstantní polohu píku pro oblast pH 10,0 – 8,0 (u DCA je to v oblasti potenciálu okolo – 1300 mV a u UDCA je to v oblasti potenciálu –1200 mV). Hodnota pKa pro obě kyseliny je 4,6 (cit. <sup>7</sup>).

Popsané trendy jsou dobře patrné ze závislosti potenciálu píku  $E_p$  DCA a UDCA na pH, které jsou zaznamenány na **obr. 5**. Je patrné, že v rozmezí pH BR pufru 8,0 – 5,0 dochází u DCA k prudkému posunu potenciálů do zápornějších hodnot, při pH 5,0 – 3,0 se pak potenciál píku pohybuje kolem –1470 mV. Zároveň dochází mezi pH 6,0 – 4,0, k prudkému nárůstu proudu píku (viz **obr. 6**), jehož výška dosahuje v oblasti kyselých pH (pH 3,0) až čtyřicetkrát větší velikosti zásaditých pH. UDCA vykazuje prudký posun potenciálu píku do oblasti negativnějších potenciálů při pH 7,0 – 5,0, na rozdíl od DCA,

ale při pH 4,0 dojde opět k posunu potenciálu píku k pozitivnějším hodnotám.

Rovněž u UDCA dochází k nárůstu proudu píku, je ale pozvolnější než u DCA a rozdíl výšek píků v kyselé oblasti (pH 3,0) a v zásadité oblasti je nižší, přibližně dvěstěnásobný.

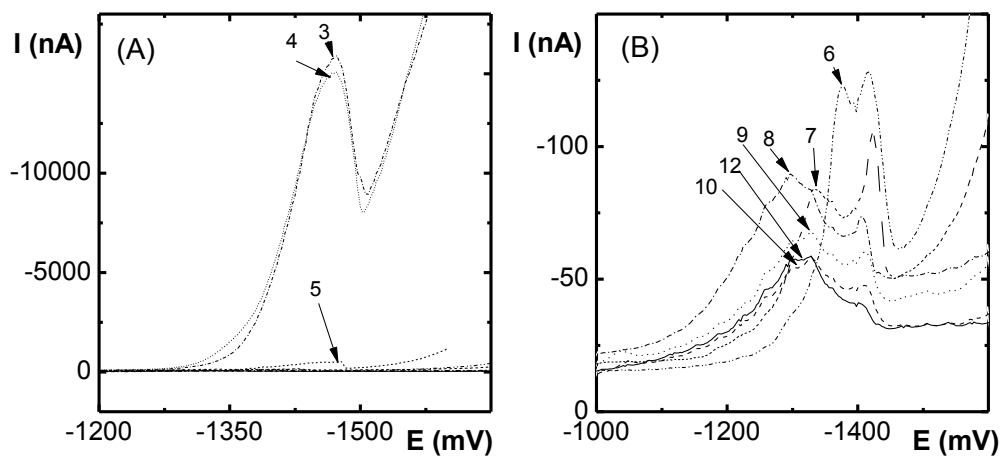
Dále je nutno poznamenat, že křivky UDCA v BR pufru 4,0 byly obtížně opakovatelné.

Uvedené změny chování obou kyselin v rozmezí pH 4,0 – 6,0 zřejmě souvisí s deionizací kyselin, tj. protonizací karboxylového aniontu v oblasti pH odpovídajícímu  $pK_a$  studovaných kyselin. Průvodním jevem je vysrážení kyselin od pH 5,0 směrem k nižším hodnotám pH. Lze také předpokládat, že v kyselém prostředí dochází k adsorpci neionizovaných kyselin na povrch elektrody.

**Tab. 3** Velikosti potenciálu píku  $E_p$  a výšky píku  $I_p$  pro kyseliny DCA a UDCA (obě  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ), v závislosti na pH BR pufru. Měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru – metanol (9:1).

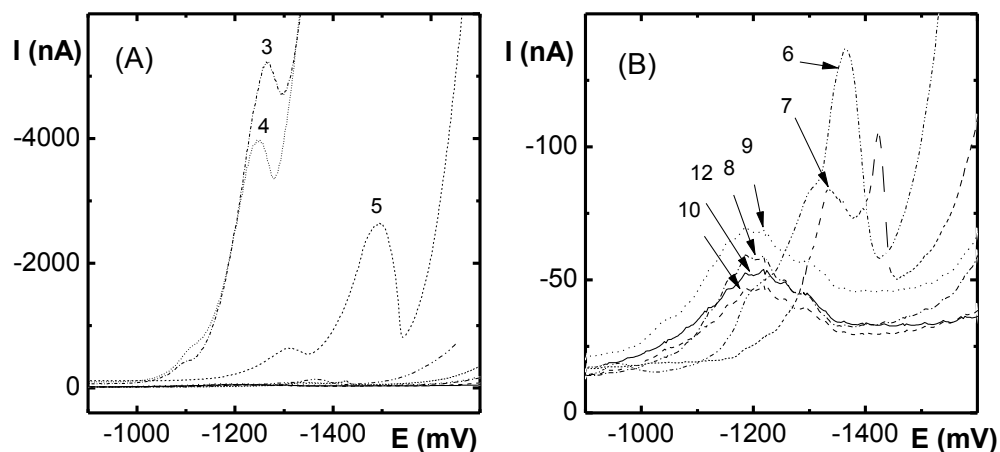
	DCA		UDCA	
pH	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)
3,0 <sup>a</sup>	-1471	-15140	-1265	-4216
4,0 <sup>a</sup>	-1466	-14230	-1240	-3120
5,0 <sup>a</sup>	-1466	-428,3	-1495	-2148
6,0	-1377	-85,3	-1361	-86,8
7,0	-1332	-55,1	-1330	-68,0
8,0	-1303	-53,8	-1190	-33,5
9,0	-1323	-37,0	-1190	-33,3
10,0	-1322	-29,5	-1200	-22,3
12,0	-1310	-32,0	-1208	-27,0

<sup>a</sup> při dané hodnotě pH došlo k vysrážení DCA či UDCA z roztoku

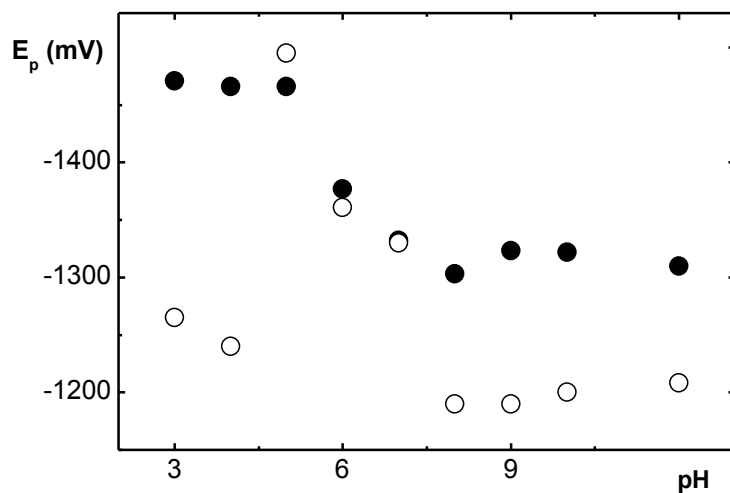


**Obr. 3** Voltamogramy DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru – methanol (9:1). Čísla se shodují s hodnotou pH BR pufru: (A) všechny hodnoty pH, (B) výřez z obr. (A).

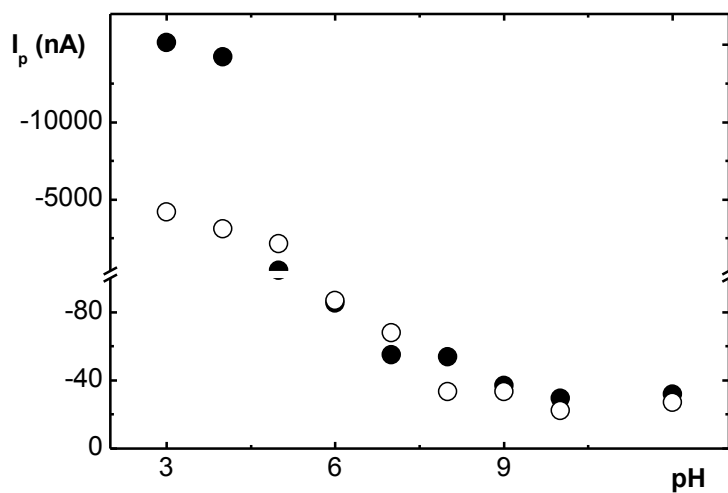




**Obr. 4** Voltamogramy UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru – methanol (9:1). Čísla se shodují s hodnotou pH BR pufru: (A) všechny hodnoty pH, (B) výřez z obr. (A).



**Obr. 5** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  kyselin DCA (●) a UDCA (○) ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na pH BR pufru, měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).



**Obr. 6** Závislosti výšky píku  $I_p$  kyselin DCA (●) a UDCA (○) ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na pH BR pufru. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

### 3.1.2. Koncentrační závislost deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

Studium koncentrační závislosti kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové bylo provedeno v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 9,0 a 4,0 metodou DCV na HMDE v koncentračním rozmezí  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Tyto hodnoty pH byly zvoleny vzhledem k rozdílnému chování obou kyselin v těchto prostředích a dále v návaznosti na studii věnovanou elektrochemické redukci kyseliny chenodeoxycholové na HMDE (cit. <sup>20</sup>), která byla studována v těchto prostředích.

Naměřené hodnoty pro pH 9,0 jsou zaznamenány v **tab. 4**, ze které je zřejmé, že potenciál píku se s rostoucí koncentrací posouval do zápornější oblasti. Zároveň se vzrůstající koncentrací se začínal vytvářet druhý pík, viditelný v rozmezí  $c = 5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Naměřené voltamogramy pro DCA v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1) jsou na **obr. 7** a voltamogramy pro UDCA v tomtéž prostředí na **obr. 8**.

Závislost potenciálu píku  $E_p$  na koncentraci  $c$  pro DCA a UDCA je na **obr. 9**, závislost velikosti proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na koncentraci  $c$  je znázorněn pro DCA na **obr. 11** a pro UDCA na **obr. 12**. U **obr. 9** jsou znázorněny závislosti pro první katodický pík.

Pro DCA sledujeme posun potenciálu prvního píku do oblasti záporných potenciálů (viz **obr. 10**), tento posun lze aproximovat v rozsahu koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  lineární závislostí  $E_p$  na  $\log c$ . Její parametry jsou uvedeny v **tab. 5**. Lineární závislost výšky prvního píku na koncentraci lze vysledovat jen pro oblast nejnižších koncentrací, tj.  $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Od koncentrace  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  začíná s rostoucí koncentrací lineárně narůstat druhý pík (viz **obr. 11**), výška prvního píku nemá jasnou koncentrační závislost. Parametry kalibrační přímky jsou v **tab. 6**. Druhý pík lze v koncentračním rozmezí  $c = 5 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  použít pro kvantitativní analytické účely, nejnižší měřitelná koncentrace je  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Pro UDCA lze s rostoucí koncentrací vysledovat posun potenciálu píku do zápornějších hodnot. Na **obr. 10** je znázorněna lineární závislost  $E_p$  na  $\log c$ , v rozsahu koncentrací  $c = 5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , parametry této závislosti jsou v **tab. 5**. Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  pro oba píky je na **obr. 12**. Lze pozorovat, že na rozdíl od DCA, kde byl druhý katodický pík využitelný pro kvantitativní analýzu, vykazuje tento v případě UDCA lineární závislost pouze mezi koncentracemi

$c = 5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , zatímco koncentrační závislost pro první pík je lineární v oblasti  $c = 5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Dále je nutno poznamenat, že u DCA a UDCA byly píky od koncentrace  $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  obtížně vyhodnotitelné.

Naměřené hodnoty pro pH 4,0 jsou pro obě kyseliny zaznamenány v **tab. 7**. Voltamogramy jsou znázorněny pro kyselinu DCA na **obr. 13** a pro UDCA na **obr. 14**. Závislost potenciálu píku  $E_p$  na koncentraci  $c$  pro obě kyseliny je na **obr. 15** a závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  pro obě kyseliny je na **obr. 16**. U **obr. 15** a **16** je pro UDCA pouze závislost prvního katodického píku. Parametry kalibrační přímky jsou uvedeny v **tab. 8**.

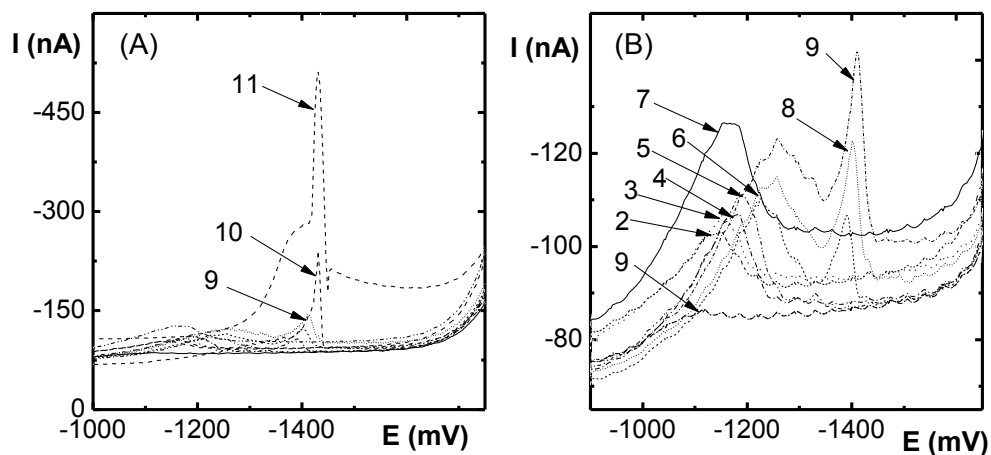
Pro DCA sledujeme na voltamogramu zápornějších hodnot, interferuje tak s rozkladem základního elektrolytu a ve voltamogramech nejsou patrné píky o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Posun potenciálu píku do záporných oblastí (**obr. 15**) je nejvýraznější v rozmezí koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , následně od koncentrace  $c = 5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  se potenciál píku už tolik s rostoucí koncentrací neposouvá. V závislosti proudu píku na koncentraci (**obr. 16**) dochází k lineárnímu nárůstu proudu píku v rozmezích koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .

U UDCA z **tab. 7** plyne, že při vyšších koncentracích od koncentrace  $c = 5 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  dochází ke vzniku druhého píku, jehož potenciál je posunut do oblasti výrazně zápornějších potenciálů než první pík. Na **obr. 14** lze pozorovat při koncentraci  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  již únik základního elektrolytu. V závislosti proudu píku na koncentraci pozorujeme lineární závislost v rozmezí koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (viz **obr. 12**)

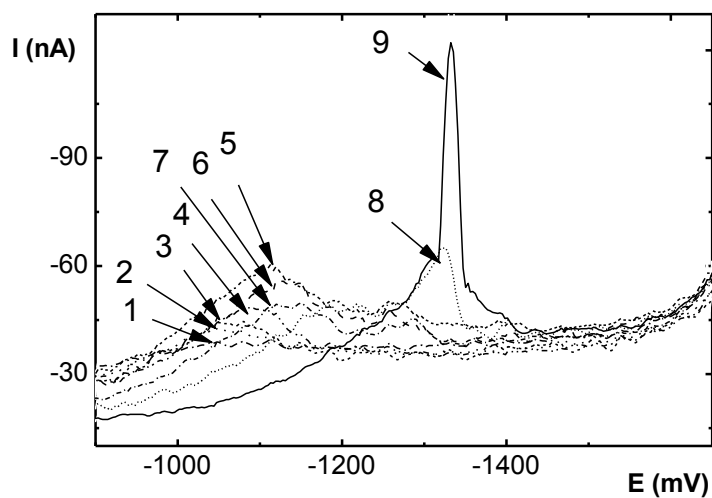
**Tab. 4** Velikost potenciálu píku  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  a výšky píku  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  pro kyseliny DCA a UDCA v závislosti na koncentraci  $c$ . Měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).

$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	DCA				UDCA			
	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
$1,0 \cdot 10^{-6}$	-1104	-3,4	–	–	-1059	-8,3	–	–
$2,5 \cdot 10^{-6}$	-1147	-19,6	–	–	–	–	–	–
$5,0 \cdot 10^{-6}$	-1156	-15,5	–	–	-1055	-8,2	–	–
$7,5 \cdot 10^{-6}$	-1171	-24,4	–	–	–	–	–	–
$1,0 \cdot 10^{-5}$	-1177	-21,1	–	–	-1076	-10,3	–	–
$2,5 \cdot 10^{-5}$	-1195	-24,4	–	–	-1090	-16,5	–	–
$5,0 \cdot 10^{-5}$	-1228	-17,6	-1391	-14,4	-1109	-19,0	-1264	-11,6
$7,5 \cdot 10^{-5}$	-1246	-24,5	-1404	-22,3	-1121	-18,2	-1264	-12,1
$1,0 \cdot 10^{-4}$	-1258	-24,8	-1410	-33,1	-1121	-15,4	-1277	-12,3
$2,5 \cdot 10^{-4}$	-1328	-13,1	-1430	-124,8	-1183	-11,1	-1327 <sup>a</sup>	-25,4
$5,0 \cdot 10^{-4}$	-1387	-94,2	-1430	-370,1	–	–	-1333	-79,6

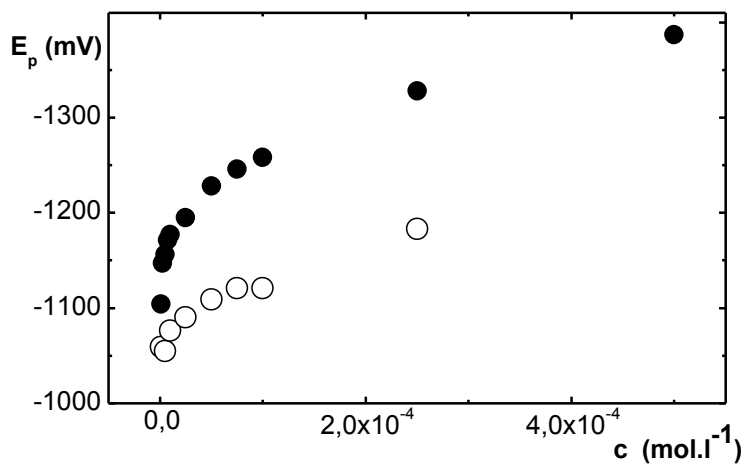
<sup>a</sup> zhoršená opakovatelnost křivek



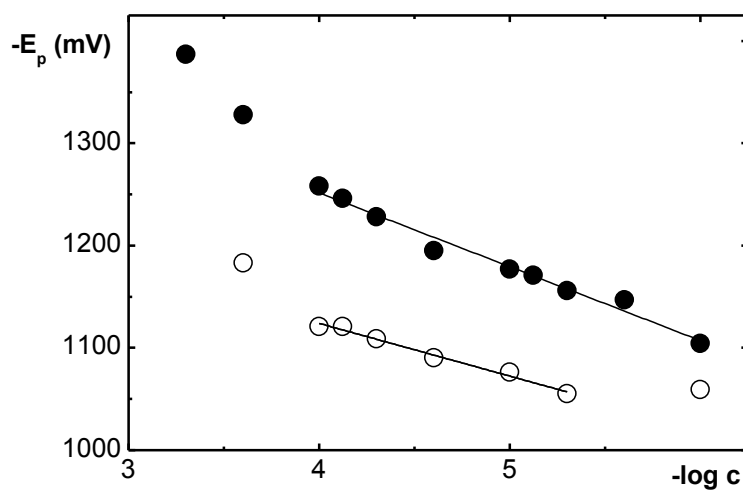
**Obr. 7** Voltamogramy DCA měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1) o koncentracích: **(A)**  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11); **(B)** výřez z obr. (A):  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (1),  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9).



**Obr. 8** Voltamogramy UDCA měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1) o koncentracích:  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (1),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9).



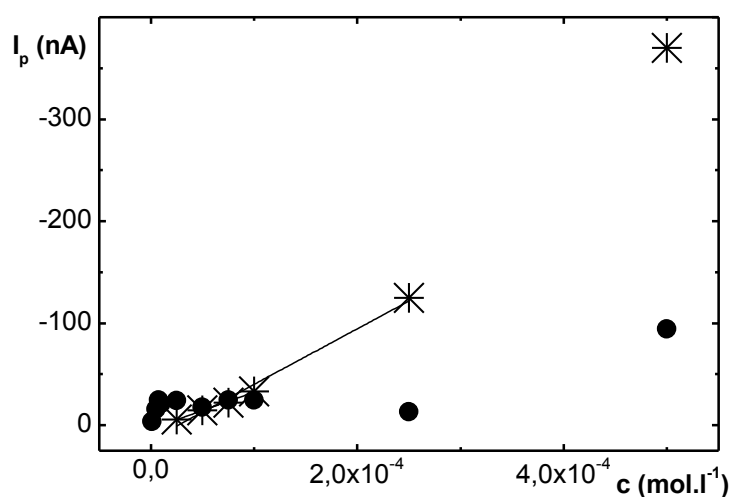
**Obr. 9** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  kyseliny DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).



**Obr. 10** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  kyseliny DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).

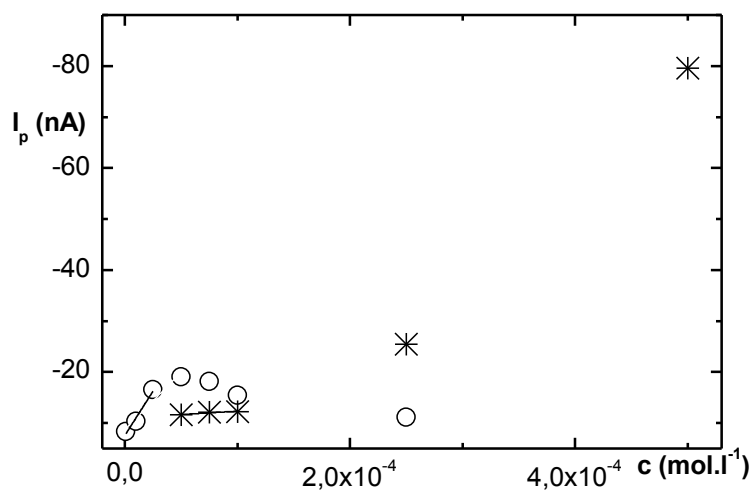
**Tab. 5** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA a UDCA metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).

látka	Pík	$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (nA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	korelační koeficient
DCA	1	$1.10^{-6} - 1.10^{-4}$	1540,19	-72,17	0,9894
UDCA	1	$5.10^{-6} - 1.10^{-4}$	1329,95	-51,5	0,9918



**Obr. 11** Závislosti proudu píků  $I_p$  kyseliny DCA na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1). Symbol pro první pík (●); symbol pro druhý pík (\*).





**Obr. 12** Závislosti proudu píků  $I_p$  kyseliny UDCA na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1). Symbol pro první pík (○); symbol pro druhý pík (\*).

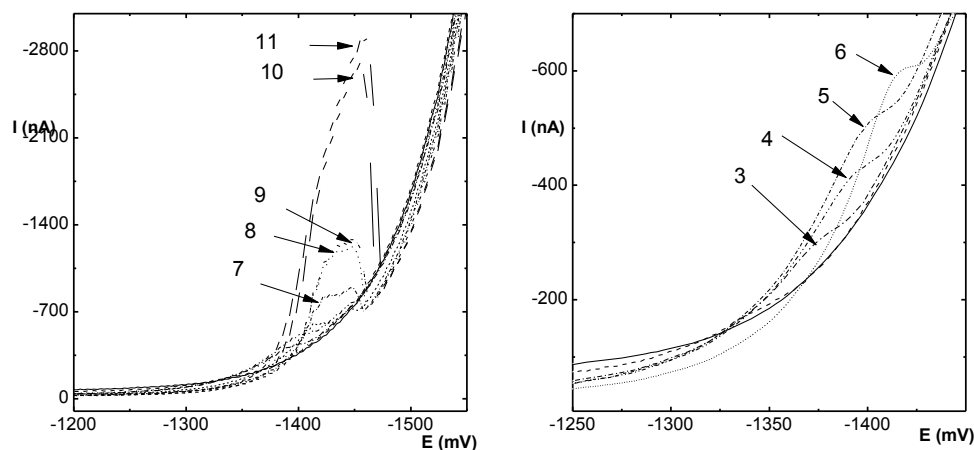
**Tab. 6** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA píku 1,2 a UDCA píku 1,2. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).

látk	p í k	$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (nA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD (mol.l <sup>-1</sup> )	LOQ (mol.l <sup>-1</sup> )
DCA	2	$5 \cdot 10^{-5}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$	$-5,45 \cdot 10^5$	-14,42	0,99701	–	–
UDCA	1	$1,0 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-5}$	$-3,47 \cdot 10^5$	-7,535	0,95954	$2,2 \cdot 10^{-6}$	$7,3 \cdot 10^{-6}$

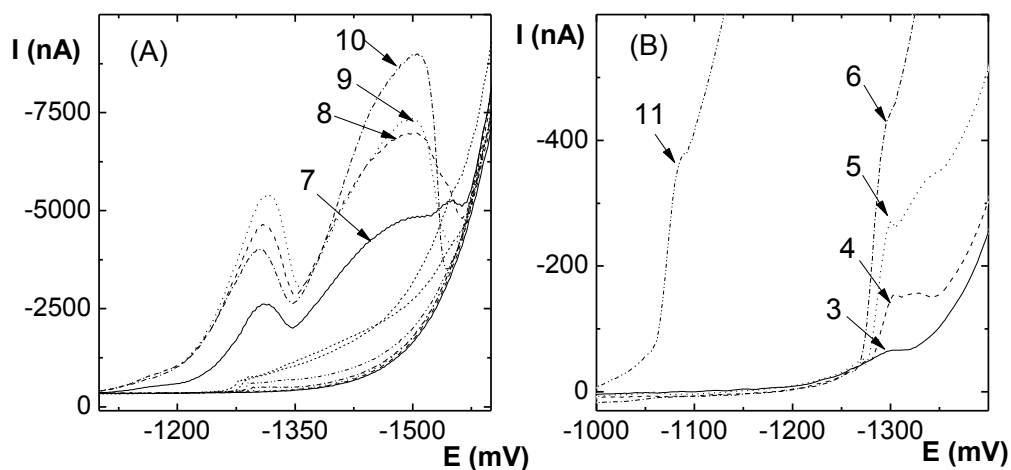
**Tab. 7** Velikost potenciálu píku  $E_{p1}$  a výšky píku  $I_{p1}$  a pro kyselinu DCA a velikost potenciálu píku  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  a výšky píku  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  pro kyselinu UDCA v závislosti na koncentraci  $c$ . Měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).

$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	DCA		UDCA			
	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
$1,0 \cdot 10^{-6}$	- 1059	- 14,3	–	–	–	–
$2,5 \cdot 10^{-6}$	- 1032	- 7,8	–	–	–	–
$5,0 \cdot 10^{-6}$	- 1373	- 173,6	- 1298	- 24,40 <sup>a</sup>	–	–
$7,5 \cdot 10^{-6}$	- 1388	- 289,1	- 1315	- 97,93 <sup>a</sup>	–	–
$1,0 \cdot 10^{-5}$	- 1399	- 391,4	- 1302	- 205,2 <sup>a</sup>	–	–
$2,5 \cdot 10^{-5}$	- 1420	- 448,5	- 1302	- 346,3 <sup>a</sup>	–	–
$5,0 \cdot 10^{-5}$	- 1441	- 691,9	- 1311	- 1723 <sup>a</sup>	- 1497	- 3051
$7,5 \cdot 10^{-5}$	- 1441	- 996,0	- 1311	- 3446	- 1498	- 4307
$1,0 \cdot 10^{-4}$	- 1441	- 1085	- 1312	- 3323	- 1498	- 5407
$2,5 \cdot 10^{-4}$	- 1448	- 2388	- 1306	- 3187	- 1509	- 6639
$5,0 \cdot 10^{-4}$	- 1450	- 2496	- 1285	- 282,1	–	–

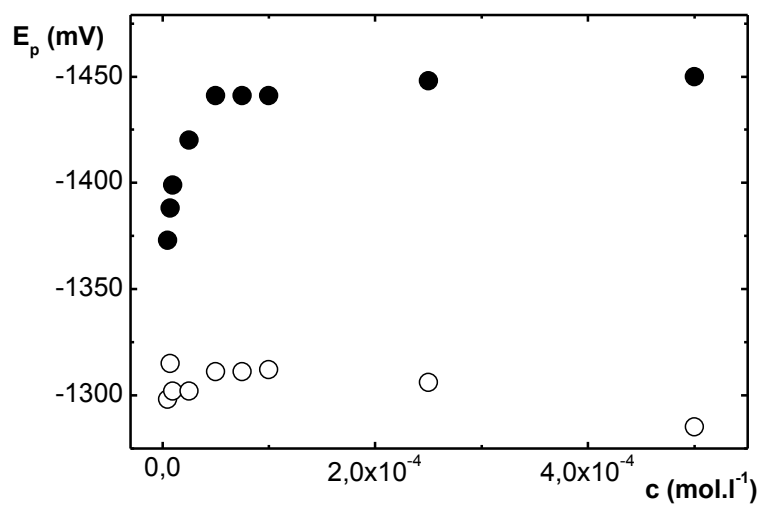
<sup>b</sup> zhoršená opakovatelnost



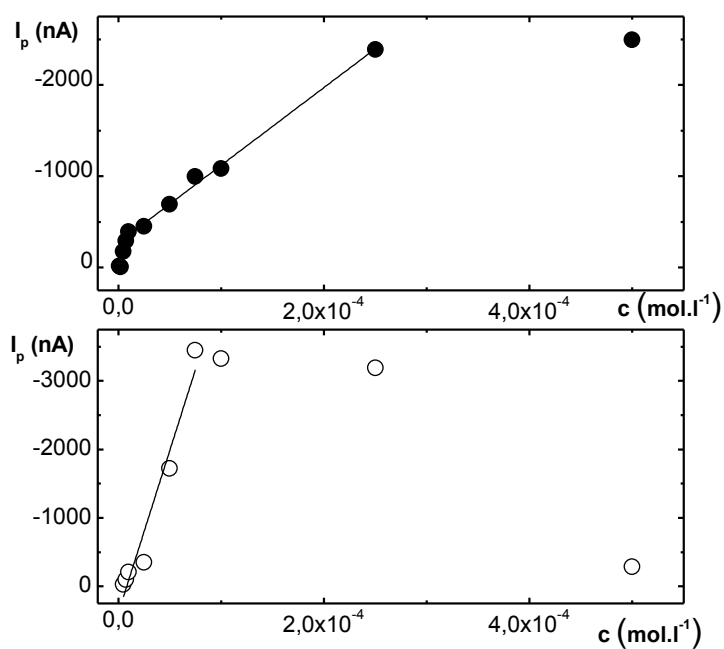
**Obr. 13** Voltamogramy DCA měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) o koncentracích: (A)  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7); (B) výřez z obr. (A)  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3).



**Obr. 14** Voltamogramy UDCA měřené metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) o koncentracích: (A)  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10); (B) výřez z obr. (A):  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11).



**Obr. 15** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  kyseliny DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).



**Obr. 16** Závislosti proudu píku  $I_p$  DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).

**Tab. 7** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA a UDCA. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (4,0) – methanol (9:1).

látka	$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (nA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	korelační koeficient
DCA	$2,5 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-5}$	$-1,83 \cdot 10^6$	-33,36	0,8349
UDCA	$2,5 \cdot 10^{-6} - 7,5 \cdot 10^{-5}$	$-8,83 \cdot 10^5$	-6,56	0,8188

## 3.2. Diferenční pulsní voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

### 3.2.1. Vliv pH prostředí na chování deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

Studium chování kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové o  $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  metodou DPV bylo prováděno stejně jako metodou DCV v prostředí BR pufr – methanol (9:1), kdy hodnoty pH BR pufru byly: 12,0; 10,0; 9,0; 8,0; 7,0; 6,0; 5,0; 4,0 a 3,0. Obě kyseliny poskytují ve studovaných prostředích katodický pík v oblasti vysoce záporných potenciálů, jehož výška je významně ovlivněna hodnotou pH. Při pH BR pufru 2,0 nebyl již voltametrický signál kyselin zaznamenán, analogicky s DCV. Příslušné hodnoty velikosti potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$  pro daná pH jsou zaznamenány v **tab. 8**, příslušné voltamogramy pro DCA jsou na **obr. 17** a pro UDCA na **obr. 18**. Z těchto voltamogramů je zřejmé, že obě kyseliny mají srovnatelnou výšku a polohu píku pro oblast pH 12,0 – 8,0 (DCA cca –1300 mV, UDCA cca –1200 mV). Při pH 7,0 – 5,0 dochází k posunu potenciálu píku  $E_p$  o přibližně 100 mV do oblasti zápornějších potenciálů a nárůstu výšky píku  $I_p$ , obzvláště v rozmezí pH 6,0 – 7,0. Při nižších hodnotách pH pak dochází k dalšímu prudkému nárůstu proudu píku. Od pH 5,0 směrem k nižším hodnotám pH prostředí docházelo k vysrážení jak DCA, tak i UDCA v daném roztoku. To je zřejmě způsobeno změnou ionizace kyselin. Hodnota  $pK_a$  je 4,6 (cit. <sup>7</sup>). Zároveň při hodnotě pH BR pufru 5,0 byly voltamogramy obou kyselin hůře opakovatelné.

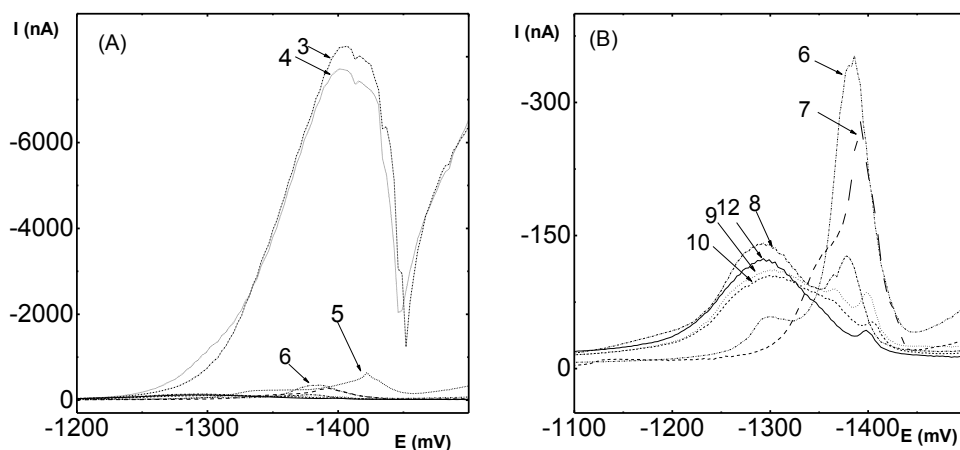
Popsané trendy jsou dobře patrné ze závislosti potenciálu píku  $E_p$  DCA a UDCA na pH, které jsou zaznamenány na **obr. 19**. Závislost proudu píku  $I_p$  na pH pro DCA a UDCA jsou zaznamenány na **obr. 20**. Je dobře patrné, že proud píku v kyselých prostředích (pH 3,0; 4,0) je přibližně osmdesátinásobkem (DCA), respektive třicetinásobkem (UDCA) hodnot proudů píku v zásaditých prostředích (pH 8,0 – 12,0). Pro UDCA jsou tedy rozdíly výšky píků v zásaditém a kyselém prostředí menší než pro DCA, stejně jako pro metodu DC voltametrie.

**Tab. 8** Velikosti potenciálu píku  $E_p$  a výšky píku  $I_p$  pro kyselinu DCA a UDCA v závislosti na pH BR pufru. Měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru–methanol (9:1).

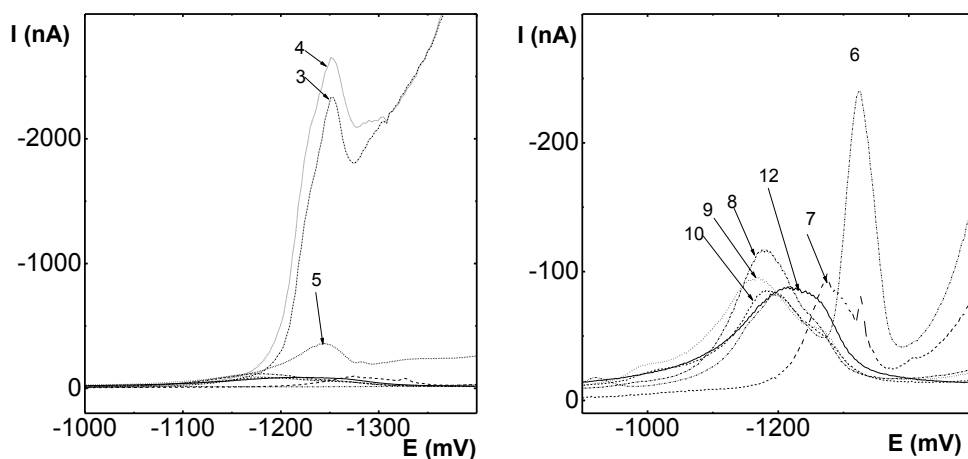
DCA			UDCA	
pH	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)
3,0 <sup>b</sup>	−1407	−8093	−1252	−2165
4,0 <sup>b</sup>	−1405	−7584	−1252	−2529
5,0 <sup>b</sup>	−1421	−460,8 <sup>a</sup>	−1249	−191,6 <sup>a</sup>
6,0	−1383	−326,1	−1324	−216,1
7,0	−1391	−219,6	−1275	−69,8
8,0	−1290	−122,0	−1181	−97,8
9,0	−1301	−97,36	−1163	−76,4
10,0	−1303	−85,05	−1200	−70,5
12,0	−1296	−105,1	−1216	−72,1

<sup>a</sup> zhoršená opakovatelnost křivek

<sup>b</sup> při dané hodnotě pH došlo k vysrážení DCA či UDCA z roztoku

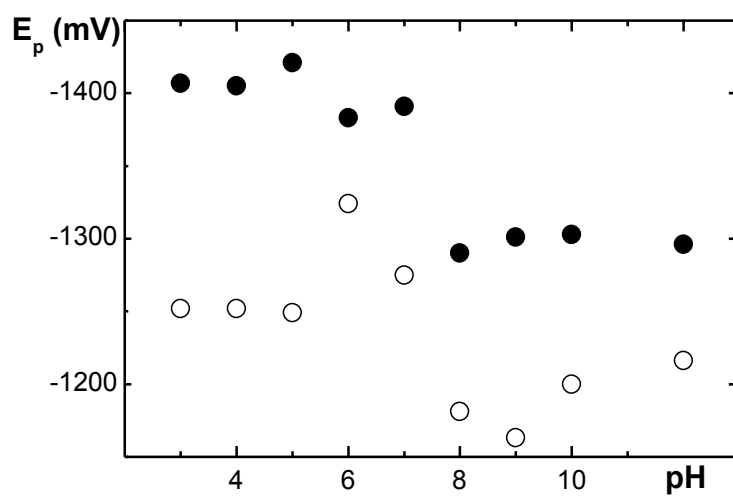


**Obr. 17** Voltamogramy DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru – methanol (9:1). Čísla u jednotlivých voltamogramů se shodují s hodnotou pH BR pufru: (A) všechny hodnoty pH, (B) výřez z obr (A).

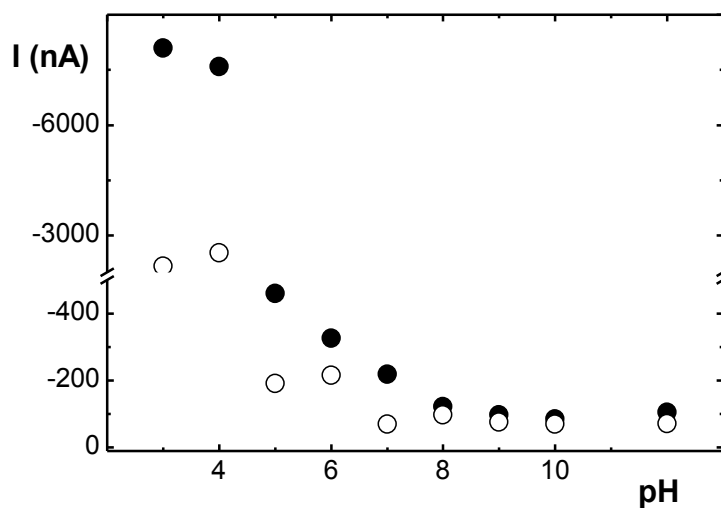


**Obr. 18** Voltamogramy UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru – methanol (9:1). Čísla u jednotlivých voltamogramů se shodují s hodnotou pH BR pufru: (A) všechny hodnoty pH, (B) výřez z obr (A).





**Obr. 19** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  DCA (●) a UDCA (○) ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na pH BR pufru, měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).



**Obr. 20** Závislosti výšky píku  $I_p$  DCA (●) a UDCA (○) ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na pH BR pufru. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

### 3.1.2.2. Koncentrační závislost deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

Studium koncentrační závislosti DCA a UDCA bylo provedeno metodou DPV stejně jako metodou DCV v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 9,0 a 4,0 na HMDE v koncentračním rozmezí  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Naměřené hodnoty pro pH 9,0 pro obě kyseliny jsou zaznamenány v **tab. 9**, ze které je zřejmé, že proud píku zpravidla roste s rostoucí koncentrací a tvoří se také druhý pík. Naměřené voltamogramy pro kyselinu DCA v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 9,0 jsou na **obr. 21** a voltamogramy pro kyselinu UDCA v tomtéž prostředí jsou na **obr. 22**. Z těchto voltamogramů je patrné, že s klesající koncentrací se potenciál píku posouvá do oblasti zápornějších hodnot. Závislost potenciálu píku  $E_p$  na koncentraci  $c$  pro DCA a UDCA je na **obr. 23**, závislost velikosti proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  je znázorněn na **obr. 25**. Závislosti na **obr. 23** a **25** jsou pouze pro první pík. Parametry kalibrační závislosti pro DCA jsou v **tab. 10**.

Pro DCA lze vysledovat tyto trendy. S rostoucí koncentrací v rozmezí koncentrací  $c = 2,5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  vzniká druhý pík. Na voltamogramu (**obr. 21,B**) lze pozorovat posun potenciálu prvního katodického píku s rostoucí koncentrací do zápornějších hodnot. V závislosti logaritmu potenciálu prvního píku na koncentraci, dochází k lineární závislosti v rozmezí koncentrací  $c = 5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (viz **obr. 24**).

Pro UDCA lze vysledovat tyto trendy. V rozmezí koncentrací  $c = 2,5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  dochází k posunu cca  $-200 \text{ mV}$  potenciálu katodického píku do zápornější oblasti (viz **obr. 23**) a proud píku poklesne (viz **obr. 26**).

Pro nejvyšší naměřené koncentrace DCA i UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) byly voltamogramy obtížně opakovatelné.

Naměřené hodnoty pro pH BR pufru (4,0) jsou zaznamenány v **tab.12**. Voltamogramy pro DCA jsou na **obr. 27** a UDCA na **obr. 28**. Závislost potenciálu píku na koncentraci pro DCA a UDCA je na **obr. 29** a koncentrační závislost proudu píku pro obě kyseliny na **obr. 30**. Závislosti jsou vyhodnoceny pro první píky kyselin. V **tab. 13** jsou zaznamenány parametry kalibrační závislosti pro obě kyseliny.

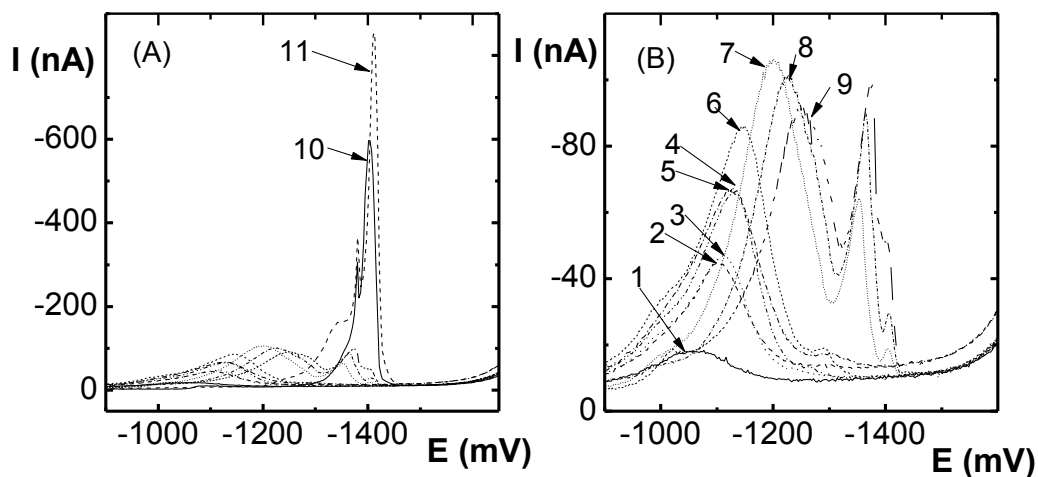
Pro DCA platí, že lineární závislost potenciálu píku na logaritmu koncentrace se

nachází v rozmezí koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (viz **obr. 24**) a závislost výšky píku na koncentraci je lineární v rozmezí koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (viz **obr. 25**).

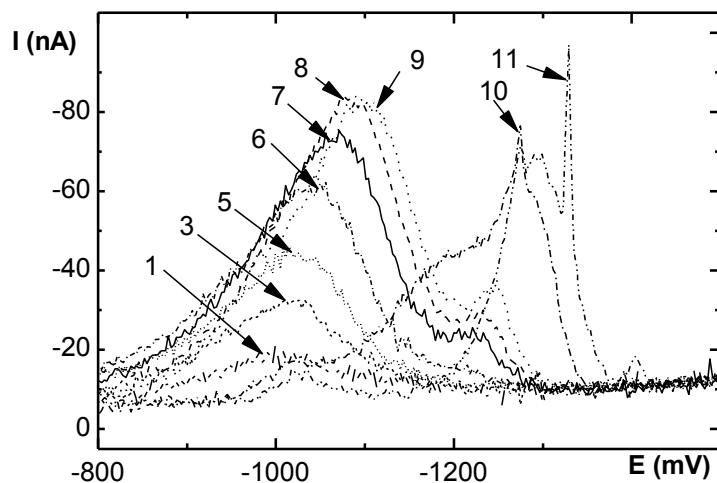
**Tab. 9** Velikost potenciálu píku  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  a výšky píku  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  pro kyseliny DCA a UDCA v závislosti na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1).

$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	DCA				UDCA			
	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
$1,0 \cdot 10^{-6}$	-1061	-9,6	–	–	-1008	-11,2	–	–
$2,5 \cdot 10^{-6}$	-1103	-33,6	–	–	–	–	–	–
$5,0 \cdot 10^{-6}$	-1106	-36,9	–	–	-1017	-21,2	–	–
$7,5 \cdot 10^{-6}$	-1124	-55,8	–	–	–	–	–	–
$1,0 \cdot 10^{-5}$	-1131	-55,4	–	–	-787	-9,6	-1027	-33,3
$2,5 \cdot 10^{-5}$	-1146	-76,5	-1292	-9,3	-794	-11,1	-1039	-49,6
$5,0 \cdot 10^{-5}$	-1201	-97,3	-1352	-53,5	-1072	-61,1	-1223	-13,6
$7,5 \cdot 10^{-5}$	-1225	-89,0	-1363	-77,1	-1087	-71,9	-1332	-19,2
$1,0 \cdot 10^{-4}$	-1252	-81,0	-1367	-84,0	-1102	-71,8	-1244	-24,3
$2,5 \cdot 10^{-4}$	-1384	-203,1	-1400	-588,0	-1014	-10,3	-1210	-36,0
$5,0 \cdot 10^{-4}$	-1384	-315,7	-1409	-842,5	-1027	-7,1	-1290	-59,1

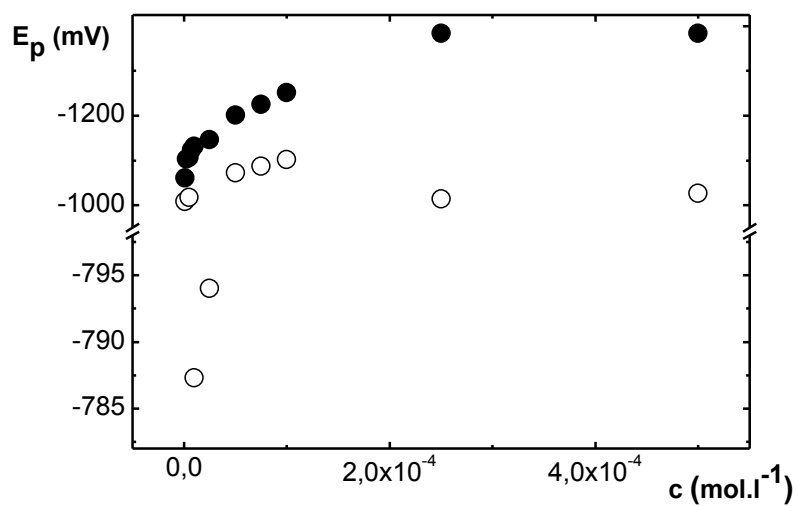
<sup>a</sup> zhoršená opakovatelnost křivek



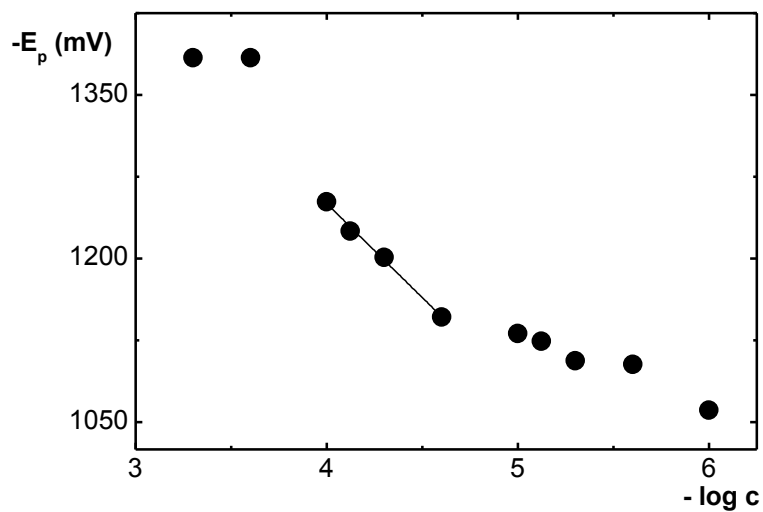
**Obr. 21** Voltamogramy DCA měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1) o koncentracích: **(A)**  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11), **(B)** výřez z obr. (A):  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (1),  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3)  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9).



**Obr. 22** Voltamogramy UDCA měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1) o koncentracích:  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (1),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3)  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11).



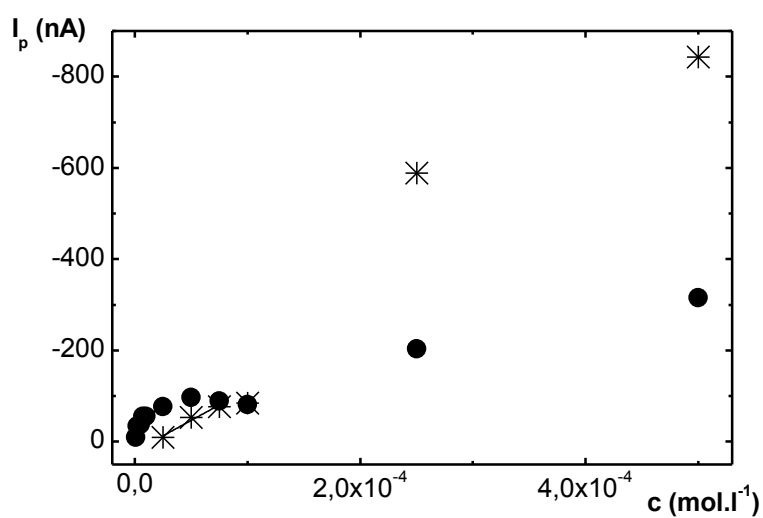
**Obr. 23** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ .  
Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 9,0) – methanol (9:1).



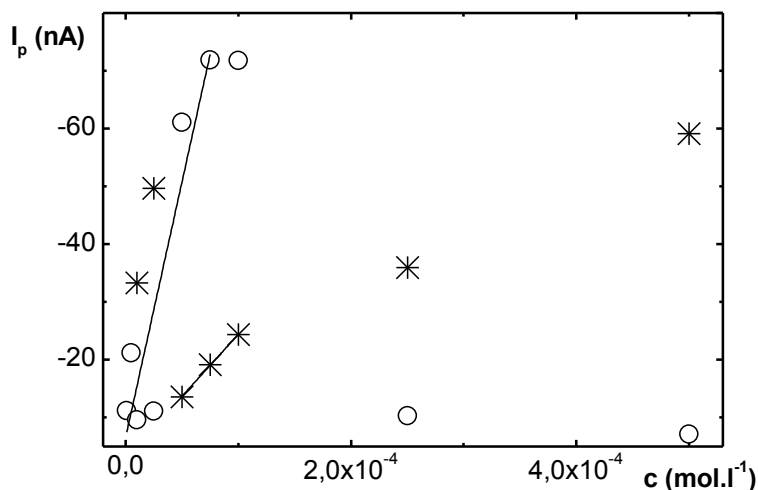
**Obr. 24.** Závislost potenciálu píku  $E_p$  DCA (●) na logaritmu koncentrace  $\log c$ .  
Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1)

**Tab. 10** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1).

látka	$c \text{ (mol.l}^{-1}\text{)}$	směrnice ( $\text{nA.mol}^{-1}\text{.l}$ )	úsek (nA)	korelační koeficient
DCA	$1.10^{-5} - 7,5.10^{-5}$	-172,4	1939,91	0,9970



**Obr. 25** Závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci  $c$  pro DCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1). Symbol první pík (●), druhý pík (\*).



**Obr. 26** Závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci  $c$  pro UDCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1). Symbol první pík (○), druhý pík (\*).

**Tab. 11** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA a UDCA. Měřeno metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (9,0) – methanol (9:1).

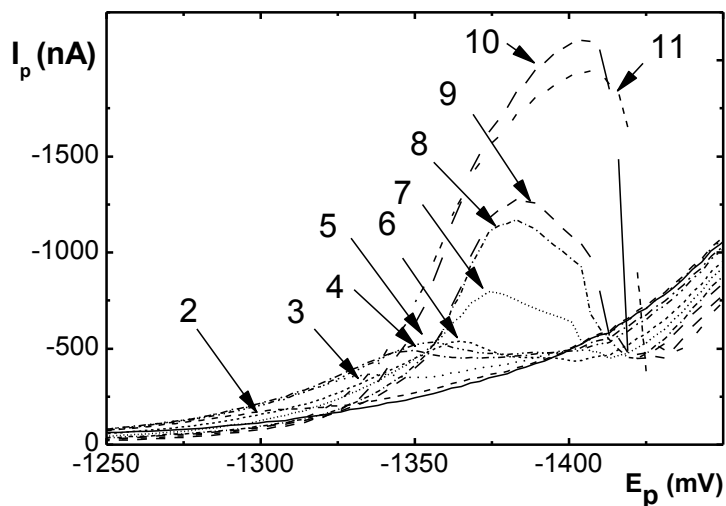
látko	pík	$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (nA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD (mol.l <sup>-1</sup> )	LOQ (mol.l <sup>-1</sup> )
DCA	1	1.10 <sup>-6</sup> – 7,5.10 <sup>-5</sup>	-2,33.10 <sup>9</sup>	-24,80	0,8486	1,5.10 <sup>-7</sup>	4,9.10 <sup>-7</sup>
DCA	2	5.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	-1,36.10 <sup>9</sup>	-21,17	0,9697		
UDCA	1	1.10 <sup>-6</sup> – 7,5.10 <sup>-5</sup>	-8,83.10 <sup>5</sup>	-6,56	0,9049	8,4. 10 <sup>-7</sup>	2,8. 10 <sup>-6</sup>
UDCA	2	5.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	-2,14.10 <sup>5</sup>	-2,98	0,9995		



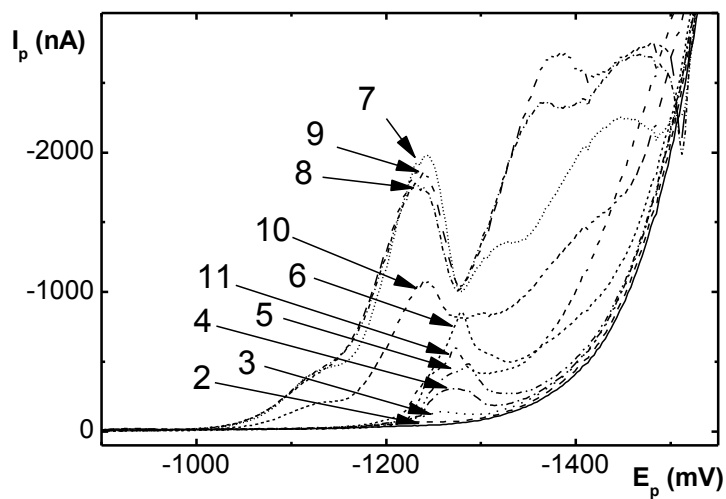
**Tab. 12** Velikost potenciálu píku  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  a výšky píku  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  pro kyselinu DCA a UDCA v závislosti na koncentraci  $c$ . Měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).

$c$ (mol.l <sup>-1</sup> )	DCA				UDCA	
	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)
$2,5 \cdot 10^{-6}$	-1302	-113,1	–	–	-1234	-11,78
$5,0 \cdot 10^{-6}$	-1335	-247	–	–	-1261	-38,03
$7,5 \cdot 10^{-6}$	-1347	-373	–	–	-1269	-233,7
$1,0 \cdot 10^{-5}$	-1352	-405,1	-1154	-10,23	-1272	-338,0
$2,5 \cdot 10^{-5}$	-1365	-442,7	-1141	-11,70	-1279	-772,7
$5,0 \cdot 10^{-5}$	-1377	-692,8	–	–	-1240	-1639
$7,5 \cdot 10^{-5}$	-1382	-1010	-1007	-1,396	-1234	-1383
$1,0 \cdot 10^{-4}$	-1380	-1094	-1007	-2,367	-1234	-1436
$2,5 \cdot 10^{-4}$	-1401	-1878	-1132	-13,70	-1240	-1376 <sup>a</sup>
$5,0 \cdot 10^{-4}$	-1404	-1717	-1153	-20,96	-1270	-365,4

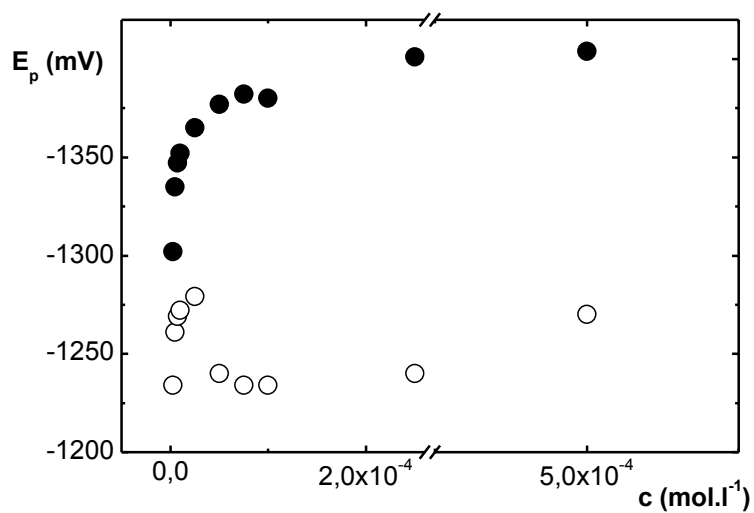
<sup>a</sup> zhoršená opakovatelnost



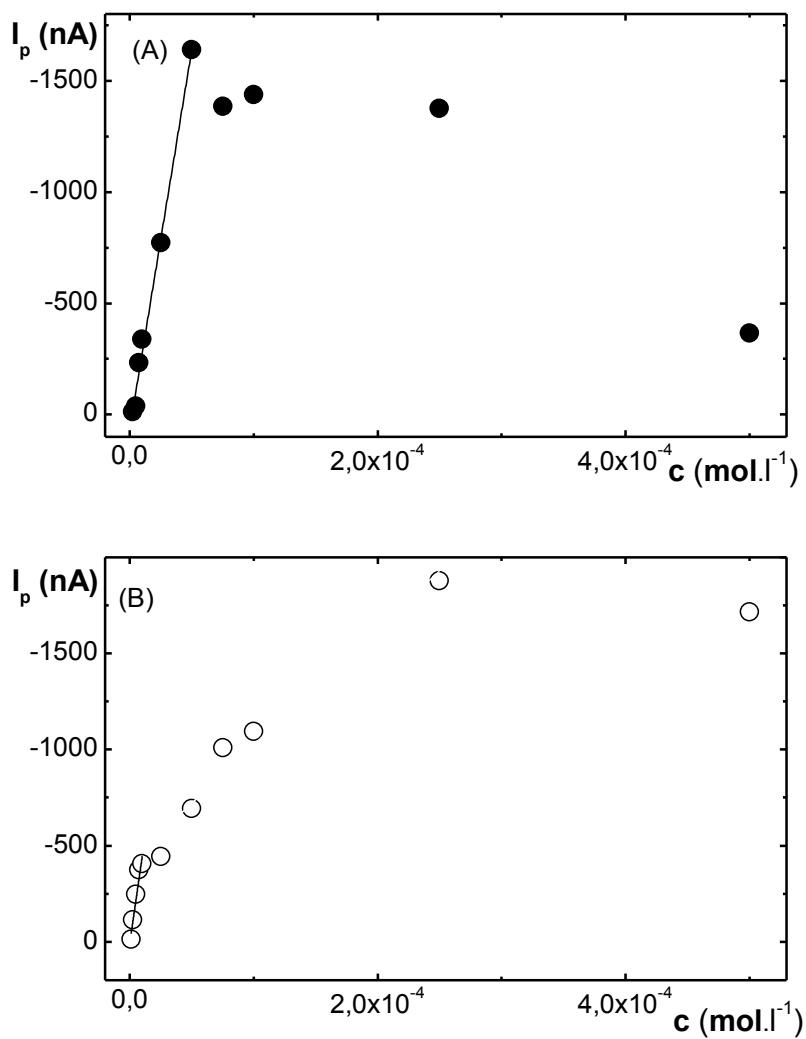
**Obr. 27** Voltamogramy DCA měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) o koncentracích:  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11).



**Obr. 28** Voltamogramy UDCA měřené metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1) o koncentracích:  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (2),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (3),  $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (4),  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (5),  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (11),  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (6),  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (10),  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (8),  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (9),  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (7).



**Obr. 29** Závislosti potenciálu píku  $E_p$  kyseliny DCA (●) a UDCA (○) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DPV na HMDE elektrodě v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).



**Obr. 30** Závislosti proudu píku  $I_p$  DCA (A) a UDCA (B) na koncentraci  $c$ . Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).

**Tab. 13** Parametry kalibrační přímky pro stanovení DCA a UDCA. Měřeno metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 4,0) – methanol (9:1).

látká	c (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (nA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	korelační koeficient	LOD (mol.l <sup>-1</sup> )	LOQ (mol.l <sup>-1</sup> )
DCA	2,5.10 <sup>-5</sup> –				4,57.10 <sup>-7</sup>	1,52.10 <sup>-6</sup>
	2,5.10 <sup>-4</sup>	-6,04.10 <sup>6</sup>	-419,77	0,9508		
UDCA	2,5.10 <sup>-6</sup> –				1,39.10 <sup>-8</sup>	4,62.10 <sup>-8</sup>
	2,5.10 <sup>-5</sup>	-4,4977.10 <sup>7</sup>	3,86	0,9892		

### 3.3. Cyklická voltametrie deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny na visící rtuťové kapkové elektrodě

#### 3.3.1. Deoxycholová kyselina při pH BR pufru 12,0

Cyklická voltametrie je metoda, která se využívá ke studiu elektrodoých dějů. V této práci byla provedena na HMDE v prostředí BR pufru (pH 12,0) – methanol (9:1). Měření bylo provedeno v rozmezí rychlostí polarizace  $\nu = 5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$ , zaznamenané voltamogramy DCA jsou znázorněny na **obr. 31**. Je zřejmé, že v katodické oblasti látka poskytuje výrazný signál, který má tvar píku s maximem při potenciálu  $-1330 \text{ mV}$  až  $-1360 \text{ mV}$  (označen jako pík  $P_{k1}$ ) a za proudovým maximem tohoto píku se nachází další ostrý katodický signál (označen jako pík  $P_{k2}$ ). „Zpětný“ anodický sken vykazuje pouze anodický pík  $P_a$ .

Proud anodického píku  $I_a$  stejně jako proud katodických píků  $I_{k1}$  i  $I_{k2}$  s rostoucí rychlostí polarizace  $\nu$  roste. Hodnoty proudů a potenciálů všech píků jsou zaneseny v **tab. 14**. Hodnota  $\Delta E_p$  byla vypočítána z rozdílu  $E_{k1}$  a  $E_a$  a dosahuje hodnot od 25 do 133 mV. Elektrodoý děj odpovídající páru píků  $E_{k1}$  a  $E_a$  lze tedy klasifikovat jako quasireversibilní. Závislosti potenciálu katodických píků  $E_{k1}$  a  $E_{k2}$  a anodického potenciálu píku  $E_a$  na rychlosti polarizace  $\nu$  jsou zaznamenány na **obr. 32**. Je zřejmé, že potenciál anodického píku  $E_a$  se posouvá s rostoucí rychlostí polarizace  $\nu$  do oblasti kladnějších potenciálů a potenciály katodických píků  $E_{k1}$  a  $E_{k2}$  se mění méně výrazně. Potenciál katodického píku  $E_{k1}$  je při nižších rychlostech polarizace obtížné vyhodnotitelný vzhledem k přítomnosti druhého píku s potenciálem  $E_{k2}$ .

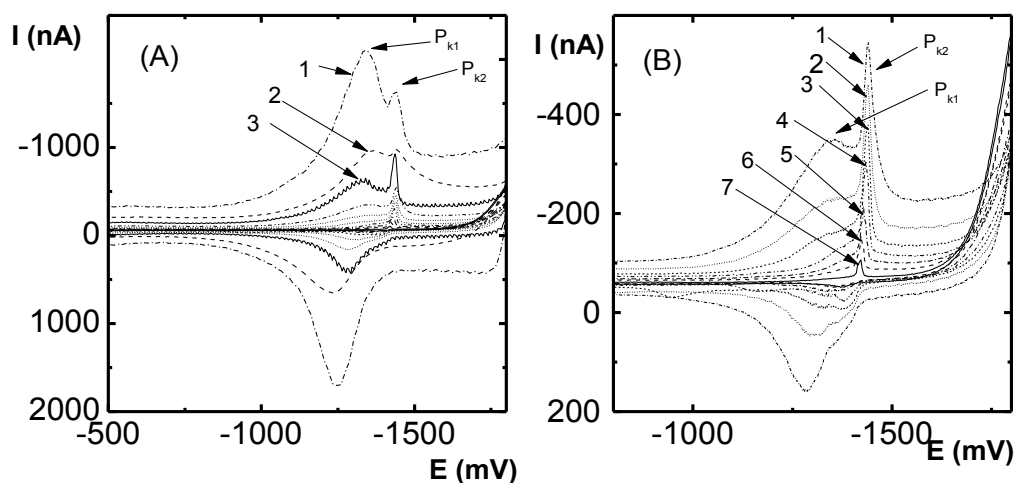
Závislost katodického a anodického proudu píku  $I_{k1}$ ,  $I_{k2}$  a  $I_a$  na rychlosti polarizace  $\nu$  je na **obr. 33**. Při nižších rychlostech polarizace v rozmezí  $\nu = 5 - 640 \text{ mV.s}^{-1}$  je závislost velikosti katodického píku  $I_{k2}$  na odmocnině z rychlosti polarizace  $\nu^{1/2}$  lineární (viz **obr. 34**), tzn., že elektrodoý děj příslušející píku  $P_{k2}$  je řízen difúzí. Závislost velikosti katodického píku  $P_{k1}$  a anodického píku  $I_a$  na rychlosti polarizace  $\nu$  je lineární (viz **obr. 33**), tzn., že elektrodoé děje příslušející těmto píkům jsou řízeny adsorpcí. Parametry obou závislostí jsou shrnuty v **tab. 15**, respektive **tab. 16**. Z těchto výsledků

vyplývá, že produkt elektrodové reakce odpovídací signálům  $P_{k1} + P_{k2}$  zůstává adsorbován na povrchu HMDE a je pak oxidován v adsorbovaném stavu.

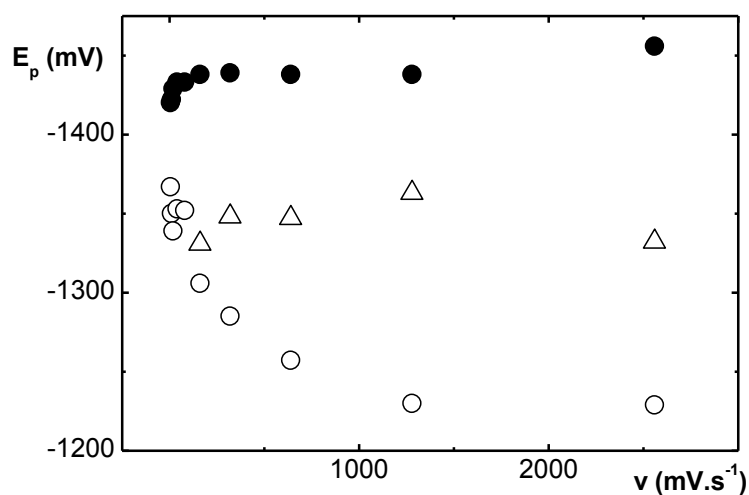
**Tab. 14** Potenciál a proudy katodických píků  $P_{k1}$  a  $P_{k2}$  a anodického píku  $P_a$  kyseliny DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Měřeno na HMDE metodou CV v rozmezí rychlosti polarizace  $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$  v prostředí BR pufr (pH 12,0) methanol (9:1).

$\nu$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	$E_{k1}$ (mV)	$E_{k2}$ (mV)	$E_a$ (mV)	$\Delta E_p$	$I_{k1}$ (nA)	$I_{k2}$ (nA)	$I_a$ (nA)
5	–	–1420	–1367		–	–27,16	8,22
10	–	–1422	–1350		–	–56,14	12,26
20	–	–1429	–1339		–	–89,28	19,55
40	–	–1433	–1353		–	–133,9	36,63
80	–	–1433	–1352		–	–211,2	63,41
160	–1331	–1438	–1306	25	–113,0	–261,1	96,43
320	–1348	–1439	–1285	63	–211,6	–324,3	194,2
640	–1347	–1438	–1257	90	–340,9	–349,1	337,7
1280	–1363	–1438 <sup>a</sup>	–1230	133	–697,1	–656,6	599,5
2560	–1332	–1456	–1229	103	–1559	–1451,4	1362

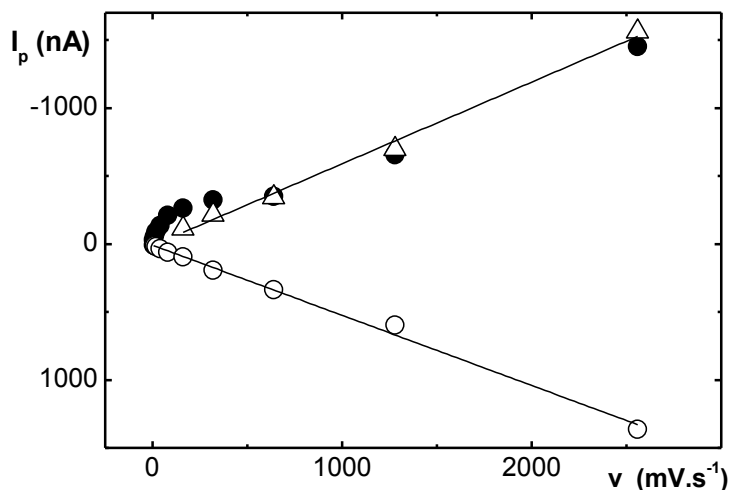




**Obr. 31** Cyklické voltamogramy DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 12,0) – methanol (9:1). Rychlost polarizace: **(A)**  $2560 \text{ mV.s}^{-1}$  (1),  $1280 \text{ mV.s}^{-1}$  (2),  $640 \text{ mV.s}^{-1}$  (3); **(B)**  $320 \text{ mV.s}^{-1}$  (1),  $160 \text{ mV.s}^{-1}$  (2),  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  (3),  $40 \text{ mV.s}^{-1}$  (4),  $20 \text{ mV.s}^{-1}$  (5),  $10 \text{ mV.s}^{-1}$  (6),  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  (7).



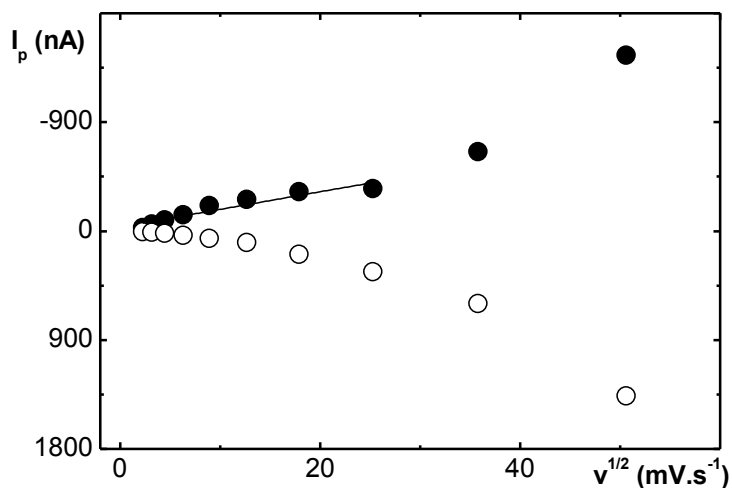
**Obr. 32** Závislost katodického  $E_{k1}$  (●),  $E_{k2}$  (Δ) a anodického  $E_a$  (○) potenciálu píku kyseliny DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace v rozmezí  $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1).



**Obr.: 33** Závislost proudu katodického píku  $I_{k2}$  (●),  $I_{k1}$  (Δ) a anodického píku  $I_a$  (○) kyseliny DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace v rozmezí  $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufru (12,0) – methanol (9:1).

**Tab. 15** Parametry lineární závislosti proudu anodického píku  $I_a$  katodického píku  $I_{k1}$  pro DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace  $v$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufru (12,0) – methanol (9:1).

proud	$v$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{nA.mV}^{-1}.\text{s}$ )	úsek (nA)	korelační koeficient
anodický	5 – 2560	0,52	9,06	0,9977
katodický	160 – 2560	–0,60	11,8	0,9964



**Obr. 34** Závislost proudu katodického a anodického píku  $I_{k2}$  (●) a  $I_a$  (○) DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na odmocnině rychlosti polarizace v rozmezí 5 – 2560  $\text{mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1).

**Tab. 16** Parametry lineární závislosti proudu katodického píku  $I_{k2}$  DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace  $v$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufru (12,0) – methanol (9:1).

proud	$v$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{nA.mV}^{-1}.\text{s}$ )	úsek (nA)	Korelační koeficient
katodický	5–640	–14,51	–34,59	0,9430

### 3.3.2. Ursodeoxycholová kyselina při pH BR pufru 12,0.

Také kyselina UDCA byla studována pomocí cyklické voltametrie v prostředí BR pufru (pH 12,0) – methanol (9:1). Měření bylo prováděno v rozmezí rychlostí polarizace  $\nu = 5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$ . Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v **tab. 17**. Voltamogramy pro UDCA jsou zaznamenány na **obr. 35.**, odkud je patrné, že se zvyšující se rychlostí polarizace se zvyšuje i proud píku a v katodické části se objevuje v rozmezí rychlostí polarizace  $10 - 320 \text{ mV.s}^{-1}$  další katodický pík (označeny jako  $P_{k1}$  a  $P_{k2}$  na **obr. 25,B**). Při rychlosti polarizace  $\nu = 5 \text{ mV.s}^{-1}$  vykazuje UDCA pouze nepatrnou velikost proudu všech píků, proto je zde určení potenciálu a proudu píku nejisté.

Závislosti potenciálu katodického a anodického píku  $E_{k1}$ ,  $E_{k2}$  a  $E_a$  na rychlosti polarizace  $\nu$  jsou znázorněny na **obr. 36**. Z tohoto obrázku plyne, že potenciál anodického píku  $E_a$  se při nižších rychlostech polarizace posouvá do zápornější oblasti a od rychlosti  $160 \text{ mV.s}^{-1}$  se posouvá zpět do kladnějších hodnot. Katodický potenciál píku  $E_{k1}$  se naopak příliš nemění, při vyšších rychlostech polarizace se mírně posouvá směrem do záporné oblasti, potenciál píku  $E_{k2}$  se také výrazně nemění.  $\Delta E_p$  pro rozdíl  $E_{k1}$  a  $E_a$  je v rozmezí  $8 - 309 \text{ mV.s}^{-1}$ . Elektrodoový děj odpovídající páru píků  $E_{k1}$  a  $E_a$  lze tedy klasifikovat jako quasireversibilní.

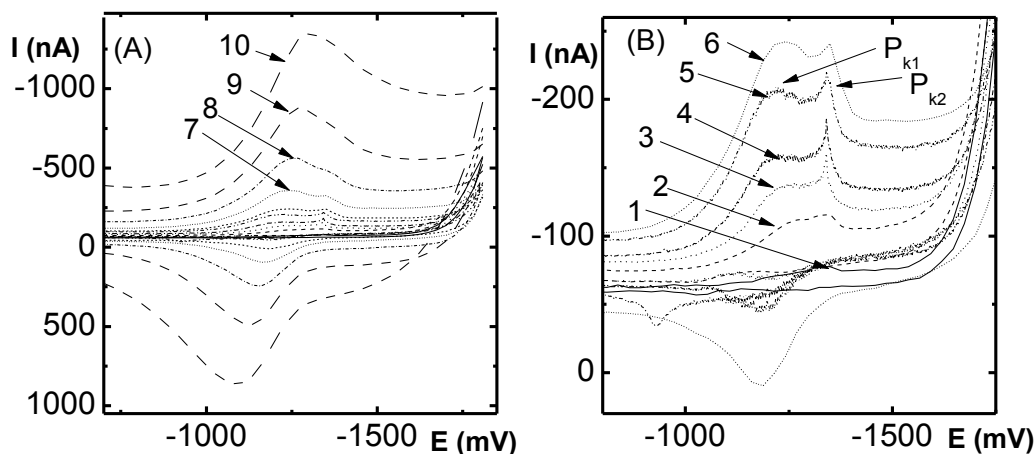
Závislosti katodického a anodického proudu píku  $I_{k1}$ ,  $I_{k2}$  a  $I_a$  na rychlosti polarizace  $\nu$  jsou na **obr. 37**. Závislost velikosti anodického píku  $I_a$  a  $I_{k1}$  na rychlosti polarizace  $\nu$  je v rozsahu  $\nu = 5 - 640 \text{ mV.s}^{-1}$ , lineární, tzn., že elektrodoový děj příslušející píku  $P_a$  a  $P_{k1}$  je řízen adsorpcí. Parametry těchto závislostí jsou shrnuty v **tab. 18**. Graf závislosti proudu na odmocnině rychlosti polarizace  $\nu$  píku  $I_{k1}$ ,  $I_{k2}$  a  $I_a$  je na **obr. 38**. Při nižších rychlostech polarizace v rozmezí  $\nu = 20 - 320 \text{ mV.s}^{-1}$  je závislost velikosti proud katodického píku  $I_{k2}$  na odmocnině  $\nu^{1/2}$  rychlosti polarizace lineární, tzn., že elektrodoový děj příslušející píku  $P_{k2}$  je řízen difúzí, viz **tab 19**.

Tyto výsledky naznačují, že UDCA je redukována v adsorbovaném stavu a produkt redukce, který je zpětně oxidován, zůstává adsorbován na elektrodoovém povrchu.

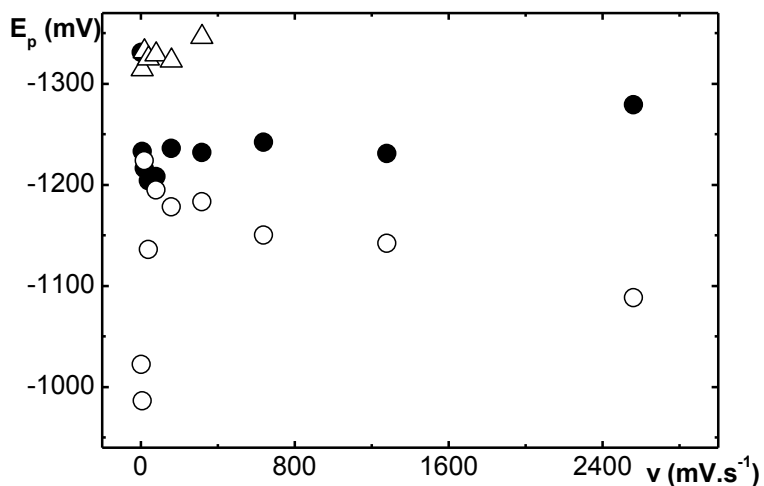
**Tab. 17** Potenciál a proudy katodických píků  $P_{k1}$  a  $P_{k2}$  a anodického píku  $P_a$  kyseliny UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Měřeno na HMDE metodou CV v rozmezí rychlostí polarizace  $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$  v prostředí BR pufr (pH 12,0) – methanol (9:1).

$\nu$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	$E_{k1}$ (mV)	$E_{k2}$ (mV)	$E_a$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{k1}$ (nA)	$I_{k2}$ (nA)	$I_a$ (nA)
5	-1331	–	-1022	309	-10,02	–	2,967
10	-1233	-1314	–	–	-23,35	-22,99	4,808
20	-1216	-1332	-1224	8	-32,49	-28,46	5,358
40	-1204	-1325	-1136	68	-45,77	-36,02	13,99
80	-1208	-1329	-1195	13	-69,11	-52,59	29,5
160	-1236	-1323	-1178	87	-92,28	-54,39	62,05
320	-1232	-1346 <sup>a</sup>	-1183	114	-162,43	-103,23	128,37
640	-1242	–	-1150	92	-282,3	–	243,87
1280	-1231	–	-1142	89	-448,33	–	370,63
2560	-1279	–	-1088	191	-668,07	–	534,73

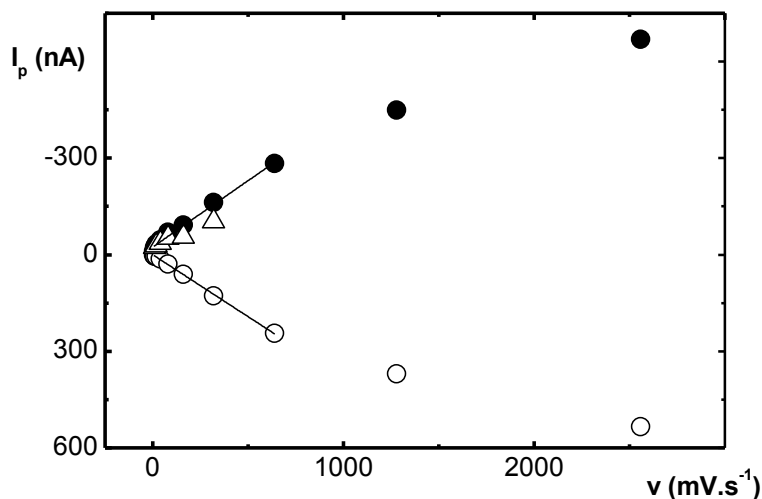
<sup>a</sup> zhoršená opakovatelnost



**Obr. 35** Cyklické voltamogramy kyseliny UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1). Rychlosti polarizace: **(A)** 2560  $\text{mV.s}^{-1}$  (10), 1280  $\text{mV.s}^{-1}$  (9), 640  $\text{mV.s}^{-1}$  (8), 320  $\text{mV.s}^{-1}$  (7); **(B)** výřez z obr. (A): 320  $\text{mV.s}^{-1}$  (7), 160  $\text{mV.s}^{-1}$  (6), 80  $\text{mV.s}^{-1}$  (5), 40  $\text{mV.s}^{-1}$  (4), 20  $\text{mV.s}^{-1}$  (3), 10  $\text{mV.s}^{-1}$  (2), 5  $\text{mV.s}^{-1}$  (1).



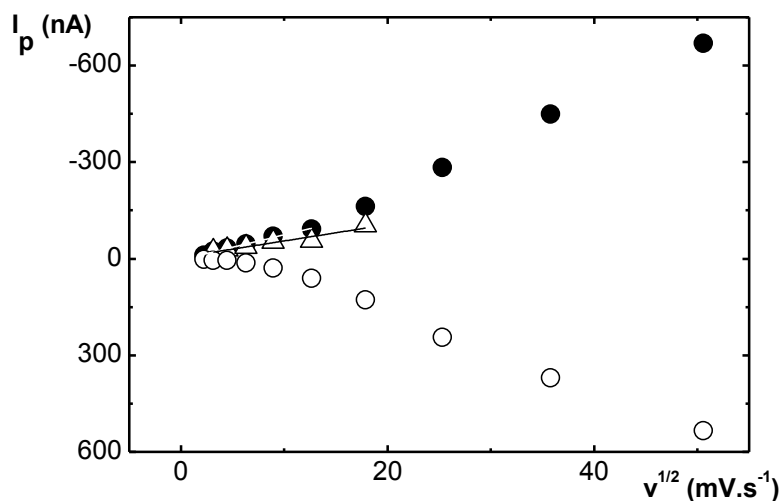
**Obr. 36** Závislost katodického  $E_{k1}$  (●),  $E_{k2}$  ( $\Delta$ ) a anodického  $E_a$  ( $\circ$ ) potenciálu píku kyseliny UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace v rozmezí 5 – 2560  $\text{mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodu CV v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1).



**Obr. 37** Závislost katodického  $I_{k1}$ (●),  $I_{k2}$  (Δ) a anodického  $I_a$ (○) proudu píku kyseliny UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace v rozmezí 5 – 2560  $\text{mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1).

**Tab. 18** Parametry lineární závislosti proudu anodického píku  $I_a$  a katodického píku  $I_{k1}$  UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace  $v$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufru (12,0) – methanol (9:1).

Proud	$v$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{nA.mV}^{-1}.\text{s}$ )	úsek ( $\text{nA}$ )	korelační koeficient
anodický	5 – 640	0,38	0,05	0,9994
katodický 1	5 – 640	–0,41	–24,04	0,9947



**Obr. 38** Závislost proudu katodického a anodického píku  $I_{k1}$  (●),  $I_{k2}$  (Δ) a  $I_a$  (○) UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na odmocnině rychlosti polarizace v rozmezí 5 – 2560  $\text{mV.s}^{-1}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufr (12,0) – methanol (9:1).

**Tab. 19** Parametry lineární závislosti proudu katodického píku  $I_{k1}$  UDCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na odmocnině rychlosti polarizace  $v^{1/2}$ . Měřeno na HMDE metodou CV v prostředí BR pufru (12,0) – methanol (9:1).

proud	$v$ ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{nA.mV}^{-1}.\text{s}$ )	úsek (nA)	korelační koeficient
$I_{k2}$	20 – 320	–5,07	–4,42	0,9575



## 4. ZÁVĚR

V této práci bylo prostudováno chování při elektrochemické redukci kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na HMDE metodami DC voltametrií, diferenční pulsní voltametrií a cyklickou voltametrií v prostředí BR pufr – methanol v poměru 9:1.

Bylo zjištěno, že DCA i UDCA mají podobné chování v závislosti na pH při obou metodách. Pro obě kyseliny poskytují v rozmezí pH 3,0 – 12,0 katodický signál ve vysoce záporných hodnotách potenciálu (ca  $-1200$  mV až  $-1300$  mV), který je u některých hodnot pH doprovázen dalším, záporněji položeným katodickým píkem. Od hodnoty BR pufru o pH 6,0 směrem do kyselejší oblasti dochází ke změně chování obou kyselin: potenciál píku se posouvá k negativnějším hodnotám a výrazně nárůstá jeho výšky. Nejvyšší nárůst proudu nastává v rozmezí pH 5,0 – 4,0, tj. v oblasti  $pK_a$  obou kyselin. Zároveň od pH 5,0 směrem ke kyselejšímu pH BR pufru docházelo k vysrážení analytu v důsledku protonizace karboxylového aniontu, tj. deionizace kyseliny.

Proměření koncentračních závislostí DCA a UDCA v rozmezí koncentrací  $c = 1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  při pH BR pufru 9,0 a 4,0 bylo prokázáno, že pro první katodický pík je průběh závislosti buď nelineární, nebo je lineární pouze v úzkém rozsahu koncentrací. Využití tohoto píku ke kvantitativní analýze za studovaných podmínek je proto problematické.

V neposlední řadě byla použita metoda cyklické voltametrie ke studiu elektrodoých dějů v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 12,0, v rozmezí rychlosti polarizace  $5 - 2560 \text{ mV.s}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že obě kyseliny poskytují pár katodický/anodický pík, příslušný elektrodoý děj lze klasifikovat jako quasireverzibilní. Oba elektrodové děje jsou řízeny adsorpcí.

Závěrem lze konstatovat, že tato pilotní studie chování DCA a UDCA na stacionární elektrodě, konkrétně HMDE, přinesla zajímavé výsledky, jejichž interpretace (mechanismus elektrodového děje, adsorpce kyselin na elektrodoý materiál, vliv ionizace kyselin) vyžaduje další podrobné studium.

## Literatura

- [1] Pecková K., Nesměrák K.: Electrochemistry of Bile Acids, Cholesterol, and Related Compounds. In *Sensing in Electroanalysis* (Kalcher K., Metelka R, Švancara I, Vytrás K. (Eds.) ), Vol. 7, University Press Centre, Pardubice, 87–96 (2012).
- [2] Liu X., Wang L., Zhang S., Deng X., Tang X., Huang X.: Electrochemical Behavior of Deoxycholic Acid on Multiwalled Carbon Nanotube Modified Electrode. *Electroanalysis* 18, 2385–2388 (2006).
- [3] Mukhopadhyay S., Maitra U.: Chemistry and Biology of Bile Acids. *Current Science* 87, 1666–1683 (2004).
- [4] Benešová L., Klouda J., Patáková A., Pišnová K., Nesměrák K., Barek J., Pecková K.: Electrochemistry of Selected Bile Acids and Phytosterols at Bare Electrodes. *XXXIII. Moderní elektrochemické metody* (Navrátil T., Pecková K., Fojta M. (Eds.), sborník přednášek. Best servis Ústí nad Labem, str. 24-28 (2013).
- [5] Hoffmann A.F., Hagey L. R.: Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology and Therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 2461–2483 (2008).
- [6] [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (staženo 17.8.2014).
- [7] <http://www.drugbank.ca/> (staženo 17.8.2014).
- [8] Hofman A. F., Roda A.: Physicochemical Properties of Bile Acids and Their Relationship to Biological Properties: An Overview of the Problem. *Journal of Lipid Research* 25, 1477–1489, (1984).

- [9] Cadena, P. G., Alberto A. N., Montenegro M. C. B. S. M., Pimentel M. C. B., Lima Filho J. L., Silva V. L.: Physical-Chemical Parameters and Validation of a Colorimetric Method for Deoxycholic and Ursodeoxycholic Acids: Kit Reagent and Optical Sensor. *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 99–105 (2011).
- [10] Český lékopis 2009. Grada Publishing, Praha.
- [11] Hirotsune I., Carey M. C.: pH–Solubility Relations of Chenodeoxycholic and Ursodeoxycholic acids: Physical – Chemical Basis for Dissimilar Solution and Membrane Phenomena. *Journal of Lipid Research* 21, 72–90 (1980).
- [12] Kakiyama G., Hosoda A., Iida T., Fujimoto Y., Goto T., Mano N., Goto J., Nambara T.: A Direct Method for Separation and Quantification of Bile Acid Acyl Glycosides by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector. *Journal of Chromatography A* 1125, 112–116 (2006).
- [13] Chatterjea S. M., Panda K.: Development of a Multiple-Bile-Ion-Sensing Membrane Electrode. *Analytical Biochemistry* 441, 218–224 (2013).
- [14] Zuman P.: Role of Mercury Electrodes in Contemporary Analytical Chemistry. *Electroanalysis* 12, 1187–1194 (2000).
- [15] Ferri T., Campanella L., De Angelis G.: Differential-Pulse Polarographic Determination of Cholic Acids. *Analyst* 109, 923–925 (1984).
- [16] Roda A., Minutello A., Angellotti M. A., Fini A.: Bile Acid Structure-Activity Relationship: Evaluation of Bile Acid Lipophilicity Using 1-Octanol/Water Partition Coefficient and Reverse Phase HPLC. *Journal of Lipids Research* 31, 1433–1442 (1990).
- [17] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2003.

- [18] Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2005.
- [19] Vyskočil V., Barek J.: Mercury Electrodes – Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39, 173–188 (2009).
- [20] Patáková A.: Studium elektrochemické redukce kyseliny chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.